

LIPOID A-
ANTIKÖRPERBESTIMMUNGEN
MIT ELISA BEI KINDERN MIT
PYELONEPHRITIS, SEPSIS UND
ANDEREN INFEKTIONEN DURCH
GRAMNEGATIVE BAKTERIEN

Michael Weiß

*Ass
München
1906*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0092

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr.von Haunerschen Kinderspital
(Direktor: Prof.Dr. H.-B. Hadorn)

LIPOID, A-ANTIKÖRPERBESTIMMUNGEN MIT ELISA BEI KINDERN
MIT PYELONEPHRITIS, SEPSIS UND ANDEREN INFEKTIONEN
DURCH GRAMNEGATIVE BAKTERIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Weiß

aus

Kelsterbach

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter : Prof.Dr.W. Marget

Mitberichterstatter : Prof.Dr.H.-B. Hadorn

Dekan : Prof.Dr.W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 28.01.1986

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einführung</u>	3
1.1. Erkrankungen durch gramnegative Bakterien	3
1.2. Fragestellung der Lipoid A-Antikörper- bestimmung	5
1.3. ELISA und andere Methoden	5
1.4. Anmerkungen zur Literatur	7
2. <u>Lipopolysaccharide und Lipoid A</u>	8
2.1. Fortschritte in der Endotoxinerforschung	8
2.2. Aufbau der Lipopolysaccharide	10
2.3. Chemische Struktur von Lipoid A	13
2.4. Biologische Aktivitäten von Lipoid A	16
3. <u>Antikörper gegen Lipoid A</u>	22
4. <u>Methodik der Antikörperbestimmung mit ELISA</u>	26
4.1. Allgemeines über den Enzymimmunoassay	26
4.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) zur Bestimmung von Antikörpern	26
4.3. Detaillierte Beschreibung des ELISA für Lipoid A-Antikörper	29
4.3.1. Material	29
4.3.1.1. Antigen	29
4.3.1.2. Pufferlösungen	30
4.3.1.3. Serumproben (Antikörper)	30
4.3.1.4. Enzymkonjugat	31
4.3.1.5. Substrat	32
4.3.2. Versuchsablauf	32
5. <u>Versuchsreihen zur Lipoid A-Antikörperbe- stimmung</u>	35
5.1. Vorversuche	35
5.1.1. Modifikation der Versuchsbedingungen	35
5.1.2. Ergebnisse und Interpretation der Versuchsmodifikationen	39

Fortsetzung Inhaltsverzeichnis

	Seite
5.2.	41
5.2.1.	41
5.2.1.1.	41
5.2.1.2.	43
5.2.1.3.	45
5.2.1.4.	45
5.2.1.4.1.	46
5.2.1.4.2.	51
5.2.2.	56
5.2.2.1.	56
5.2.2.2.	57
5.2.2.3.	59
5.2.2.4.	62
5.2.2.4.1.	62
5.2.2.4.2.	66
5.2.2.4.3.	73
5.2.2.4.4.	81
5.2.2.4.5.	87
5.2.3.	90
5.2.3.1.	90
5.2.3.2.	91
5.2.3.3.	91
6.	92
6.1.	92
6.2.	95
6.3.	109
7.	114
8.	117

1. Einführung

1.1. Erkrankungen durch gramnegative Bakterien

Bakterielle Infektionen haben nach wie vor große Bedeutung für die Morbidität und Mortalität von Patienten im Kindesalter. Durch zivilisatorische Einflüsse und die rapide Entwicklung der Antibiotika findet ein ständiger Erregerwechsel hinsichtlich der Häufigkeit und Schwere der infektiösen Erkrankungen statt. Im Gegensatz zu klassischen Infektionen wie z.B. Tuberkulose, Typhus oder Meningokokken-Meningitis, bei denen der Krankheitsverlauf wesentlich vom infektiösen Agens bestimmt wird, rücken immer mehr opportunistische oder nosokomiale Infektionen in den Vordergrund. Bei diesen Infektionen spielen der Allgemeinzustand der Patienten, chronische oder passagere Abwehrschwächungen eine sehr große Rolle. Für die Ätiologie und Pathogenese infektiöser bakterieller Erkrankungen gewinnen daher auch dispositionelle Faktoren der betroffenen Patienten an Gewicht (94).

Gramnegative Organismen haben als Ursache bakterieller Infektionen deutlich zugenommen; das toxische Prinzip der gramnegativen Bakterien sitzt als Lipopolysaccharid auf der äußeren Membran der Zellwand. Bei der Erforschung des Aufbaus und der Eigenschaften der Lipopolysaccharide zeigte sich, daß nicht die Region mit den speziesspezifischen Polysaccharidstrukturen, sondern der innen gelegene unspezifische Lipoid A-Anteil für die biologische Aktivität der Endotoxine verantwortlich ist (129). Lipoid A wirkt in seiner kryptogenen Position aber auch als schwaches Antigen und fördert die Bildung von spezifischen Lipoid A-Antikörpern (37). Es ist noch nicht geklärt, ob der Zelltod des Bakteriums und die Lysis der Freisetzung des Endotoxins und der Entfaltung der Immunogenität des Lipoid A's unbedingt vorausgehen müssen (6).

Viele gegenwärtige Untersuchungen gelten der Rolle von Mediatoren z.B. aus Makrophagen bei der Vermittlung der endotoxischen Effekte. Seit der Entdeckung der Lipoid A-Antikörper wurde die Frage interessant, ob diese bei der Auseinandersetzung des infizierten Organismus mit dem Lipoid A-Antigen nützen oder schaden. Auf der einen Seite wurde der schützende Effekt von Lipoid A-Antiserum gegen die Fieberinduktion durch Lipopolysaccharide oder Lipoid A festgestellt (103). Andererseits existieren seit den sechziger Jahren wichtige Hinweise für die schädigende Rolle bakteriellen Antigens bei der Pathogenese der Pyelonephritis. Mit Immunfluoreszenztechnik wurden Antikörper gegen bakterielles Antigen bei Patienten mit histologischen Zeichen einer interstitiellen Nephritis nachgewiesen, auch wenn klinische Symptome oder Bakteriurie fehlten (2). Damit kann es sich auch bei den sogenannten abakteriellen Pyelonephritiden um chronische Erkrankungen handeln, bei denen im Gewebe verbliebene Immunkomplexe aus bakteriellem Antigen und Antikörpern eine Schädigung hervorrufen (109). M. Westenfelder gelang es mit Tierexperimenten, die Lipoid A-Antikörper als Substrat der pathologischen Immunreaktion im Nierengewebe bei der chronischen Pyelonephritis darzustellen (122, 123).

Durch Untersuchungen mit Antiseren gegen Endotoxin konnte ein Schutzeffekt bei an gramnegativer Bakteriämie Erkrankten festgestellt werden (13). Aktuelle kontrollierte Studien belegen eine wesentliche Senkung der Letalität bei Sepsis-Patienten nach der Behandlung mit menschlichen Antiseren gegen Lipopolysaccharide oder inkomplette Bakterien wie J5-Mutanten von E. coli (69, 139).

Zu diskutieren bleibt, ob die Protektion durch einen einheitlichen Antikörper wie Lipoid A bewirkt wird und welche weiteren therapeutischen Möglichkeiten sich ergeben werden (134).

1.2. Fragestellung der Lipoid A-Antikörperbestimmung

In den experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden Lipoid A-Antikörper im Serum von Kindern mit verschiedenen Infektionen durch gramnegative Bakterien bestimmt. Ausgehend von bakteriologischen Befunden in der Kinderklinik waren Serumproben gesammelt und eingefroren worden. Den Hauptanteil stellten Patienten mit akuten oder chronischen Harnwegsinfektionen. Waren aus der Krankengeschichte bereits morphologische Nierenveränderungen zu entnehmen, wurden die Patienten der sogenannten Pyelonephritis-Gruppe zugeteilt. Für besonders interessant hielten wir den Gehalt der Lipoid A-Antikörper im Serum von sepsiskranken Kindern. Es wurden aber auch Serumproben von Patienten mit anderen bakteriellen Infektionen in die Untersuchung einbezogen. Dabei sind Kleinkinder mit pathologischer Trachealkolonisation oder Patienten mit Wundinfektionen durch gramnegative Bakterien neben einer Kontrollgruppe ohne Infektion zu erwähnen. In Einzeltestungen erfaßten wir Patienten mit Meningitis, Morbus Crohn und Mukoviszidose. In der Arbeit werden ausführlich die Ergebnisse der Querschnittsuntersuchung für die verschiedenen Krankheitsgruppen und die Verlaufsbeobachtung ausgewählter Einzelfälle besprochen. Die vorläufigen Ergebnisse der Querschnittsuntersuchung über Lipoid A-Antikörper veröffentlichten W. Marget, M. Weiß und B. Ruhland 1983 in der Zeitschrift Infection (77), sie waren auch Gegenstand eines Vortrages auf dem "International Congress for Infectious Diseases" in Wien 1983 (78).

1.3. ELISA und andere Methoden

Frühere Untersuchungen von Lipoid A-Antikörpern im Serum waren mit dem passiven Hämolysetest durchgeführt worden (112). Schon 1971 wurde eine andere Methode zur Entdeckung von Lipoid A-Antikörpern mit vorbehandelten Liposomen be-

schrieben (61). Als einfacher Test für die Bestimmung von Endotoxinen ist der Limulus-Amöbozytenlysattest (LAL-Test) bekannt, bei dem Blutkörperchen des Pfeilschwanzkrebss (*Limulus polyphemus*) unter bestimmten Bedingungen mit Endotoxin ein Gel bilden (5, 30, 63).

Einen bedeutenden Fortschritt brachte die Entwicklung des Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in den siebziger Jahren, der inzwischen in vielen Bereichen der klinisch-chemischen und mikrobiologischen Diagnostik eingesetzt wird. Der prinzipielle Ablauf des ELISA und seine mannigfaltigen Anwendungen sind Übersichtsarbeiten zu entnehmen (25, 49, 105, 108, 113, 116, 132). Für unsere Lipoid A-Antikörperbestimmungen verwendeten wir einen Test vom sandwich-Typ, der sich bis auf einige Modifikationen an die Empfehlungen von E. Engvall (24) anlehnt und im Abschnitt Methodik dieser Arbeit detailliert erläutert wird. Mit einer ähnlichen Methode führte eine schwedische Arbeitsgruppe um I. Mattsby-Baltzer Lipoid A-Antikörperbestimmungen durch (80, 81). P.C. Fink setzte bei seinem ELISA für Lipoid A-Antikörper und auch Lipoid A-Antigen ein anderes Enzymsystem ein (27). Mit ELISA, der als wesentlichen Vorteil die getrennte Bestimmung von IgM- und IgG-Antikörpern erlaubt, wurden aber nicht nur Lipoid A-Antikörper gemessen. Mit leichten Abwandlungen war es möglich, spezifische Antikörper gegen inkomplette Lipopolysaccharide nachzuweisen, wie z.B. gegen die Re-Mutante von *Salmonella minnesota* oder den J5-Stamm von *E. coli* (26, 56). Mit dem ELISA können also auch ganz spezifisch die Lipopolysaccharide einzelner Bakterien (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*) ohne Kreuzreaktionen bestimmt werden (68).

1.4. Anmerkungen zur Literatur

Im Literaturverzeichnis werden die wichtigsten Originalarbeiten zur Erforschung der Lipopolysaccharide und speziell des Lipoid A-Anteils aufgeführt, wobei in besonderem Maße die Publikationen der Freiburger Arbeitsgruppen um Otto Westphal und Chris Galanos zu berücksichtigen sind. Da in den letzten Jahren immer neue Lipoid A-Strukturen bei verschiedenen gramnegativen Bakterien aufgedeckt wurden, enthält der Literaturteil neben Übersichtsarbeiten der bakteriellen Endotoxine Beiträge zur Grundlagenforschung. Weitere Schwerpunkte bei der Auswahl der aufgenommenen Arbeiten waren klinische Berichte über Lipoid A-Antikörper und die in jüngster Zeit aktuellen Therapieversuche mit Antiseren. Auf die ELISA-Beschreibungen wurde bereits hingewiesen.

Die Aktualisierung des Literaturverzeichnisses erfolgte unter Benutzung der "Current Contents/Life Sciences" und der DIMDI-Angaben zu bestimmten Stichworten.

2. Lipopolysaccharide und Lipoid A

2.1. Fortschritte in der Endotoxinerforschung

Bei der Erforschung der gramnegativen Bakterien galt den für die endotoxischen Wirkungen verantwortlichen Zellstrukturen großes Interesse. Früh wurde die Möglichkeit entdeckt, mit als Pyrotoxin bezeichneten Präparationen aus Typhusbakterien und anderen Organismen Fieber hervorzurufen (E. Centanni, 1893).

Durch zahlreiche Tierexperimente wurden im Laufe des 20. Jahrhunderts immer neue biologische Aktivitäten der Endotoxine bekannt und Versuche mit Injektionen beim Menschen durchgeführt. Die Injektion von abgetöteten endotoxinproduzierenden Bakterien setzten R. Winter und F. Hoff zur Induktion künstlichen Fiebers als unspezifische Therapie-maßnahme bei chronisch entzündlichen Prozessen ein (um 1950). Schon in den vierziger Jahren beschrieben H.R. Morgan und P.B. Beeson die nachlassende Fieberreaktion bei wiederholten Endotoxingaben als sogenannte Endotoxintoleranz.

Als weitere Beispiele sind die Untersuchungen über die Interaktion von Endotoxin mit dem Komplementsystem, die Aktivierung des fibrinolytischen Systems oder die stimulierende Wirkung auf B-Lymphocyten zu erwähnen.

Einen ausführlichen Überblick der Fortschritte in der Endotoxinforschung gibt Otto Westphal in seiner 1975 verfaßten Carl Prausnitz-Gedächtnisvorlesung mit vielen historischen Literaturzitaten (127).

Mit verschiedenen Präparationsmethoden wurde der Aufbau der Zellwände gramnegativer Bakterien analysiert, um die chemische Struktur des endotoxischen Komplexes herauszufinden. A. Boivin und L. Mesrobianu extrahierten die als Endotoxin wirksamen Zellwandbestandteile in den dreißiger Jahren mit Trichloressigsäure aus Enterobacteriaceae, während W.T.J. Morgan zur gleichen Zeit die milde Extraktion

mit Diethylenglykol einführte. Die sowohl immunogen als auch endotoxisch wirksamen Extrakte bestanden aus drei charakteristischen Komponenten, die Morgan und S.M. Partridge 1942 mit verschiedenen Dissoziationsmethoden aufdeckten. Dabei handelte es sich um das speziesspezifische Polysaccharid, einen konjugierten Proteinkomplex und ein Phospholipid. Mit einer anderen Variante, der Pyridin-Wasser-Methode, isolierte W. Goebel den endotoxischen Komplex aus *Shigella flexneri*. Er konnte den Komplex mit Hydrolysen in ein toxisches Polysaccharid und nicht-toxisches Protein oder in ein nicht-toxisches Polysaccharid und toxisches Protein spalten. Daraus leitete er die Stellung der chemisch noch nicht definierten endotoxischen Komponente "T" zwischen dem Protein und Polysaccharid der Zellwand ab.

Die Literaturangaben der Originalartikel von Boivin, Morgan und Goebel sind weiteren Übersichtsarbeiten von O. Westphal zu entnehmen (128, 129).

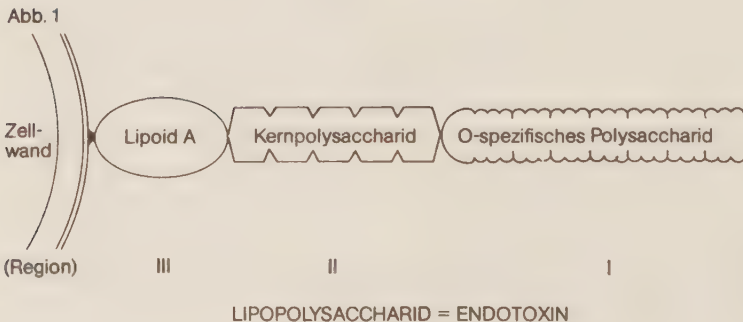
In den fünfziger Jahren extrahierten O. Westphal und O. Lüderitz gramnegative Bakterien mit der Phenol-Wasser-Methode bei 65-68°C (125). Nach Abkühlen fanden sie in der wäßrigen Schicht fast proteinfreie Lipopolysaccharide (LPS) und Nukleinsäuren, in der Phenolphase reines Protein. Die gereinigten Lipopolysaccharide zeigten neben Immunogenität starke endotoxische Eigenschaften. Durch Behandlung mit milder Säure wurden die Lipopolysaccharide in einen Polysaccharid- und einen Lipoid-Anteil gespalten, den Westphal und Lüderitz Lipoid A nannten. Mit biologischen Testungen kamen sie zu dem Ergebnis, daß die Lipoid A-Komponente der LPS für die Pyrogenität und die anderen endotoxischen Wirkungen verantwortlich sein muß, während die polysaccharidischen Gruppen die sogenannte O-Spezifität der gramnegativen Bakterien bewirken (126).

2.2. Aufbau der Lipopolysaccharide

Chemische Analysen vieler Forschergruppen führten zur Strukturdarstellung der Lipopolysaccharide. Aus der Familie der Enterobacteriaceae wurden dabei hauptsächlich Bakterien der Gattungen *Salmonella* und *Escherichia* ausgewählt, aber auch seltenere Stämme untersucht und verglichen. Generell bestehen die Lipopolysaccharide aus drei typischen Regionen. Nach außen tragen die Lipopolysaccharidmoleküle die O-spezifische Polysaccharidkette als Region I. Zentral liegt in der Region II das R-spezifische Kernpolysaccharid, innen stellt der toxische Lipoid A-Anteil als Region III die Verbindung des Lipopolysaccharids mit der Zellwand des gramnegativen Bakteriums her.

In der neueren Literatur werden die Bezeichnungen Lipopolysaccharid und Endotoxin synonym verwendet (72).

Die folgende Abbildung zeigt den Aufbau der Lipopolysaccharide in schematisierter Form:



Die O-spezifische Polysaccharidkette (Region I) ist aus sich wiederholenden Einheiten von Oligosacchariden aufgebaut. Es handelt sich dabei um den variabelsten Teil der Lipopolysaccharide. Die O-Ketten enthalten die immunodeterminanten Strukturen, gegen die bei einer Infektion oder Immunisierung für das betreffende Bakterium spezifische Anti-O-Antikörper gebildet werden. Die O-Antigene der Lipopolysaccharide bestimmen die unterschiedlichen Serotypen der gramnegativen Bakterien. Durch die Analyse der Zuckerbausteine konnten die serologischen Spezifitäten für die zahlreichen Derivate einer Bakteriengattung ermittelt werden. Bekannt ist zum Beispiel das Kauffmann-White-Schema für die Klassifikation der *Salmonella*-Bakterien. Eine Zusammenstellung gramnegativer Serotypen, deren O-Kettenstruktur in den letzten Jahren aufgedeckt wurde, veröffentlichten O. Lüderitz et al. 1982 (72).

Die Kernpolysaccharide der gramnegativen Bakterien zeigen weniger Variabilität als die O-Ketten. So tritt das Kernpolysaccharid von *Salmonella typhimurium* bei allen *Salmonellen*arten und einigen anderen *Enterobacteriaceae* auf.

Die chemische Struktur der Kernpolysaccharide wurde an sogenannten R-Mutanten untersucht. R(rough)-Mutanten oder Rauhformen entstehen unter bestimmten Kulturbedingungen aus den normalerweise als Glattformen (smooth, S-Formen) wachsenden *Enterobacteriaceae*. Der morphologische Wandel der glatten Kolonien (S-Form) zu einer rauen Oberfläche (R-Form) ist mit dem Verlust des O-Antigens verbunden; das heißt, daß alle R-Formen keine O-Kette mehr besitzen. Die Bildung der R-Formen ist auf einen Defekt in der Polysaccharidsynthese der LPS zurückzuführen. Je nach Sitz des Synthesedefektes werden komplette oder inkomplette Kernpolysaccharide bei den nicht mehr pathogenen R-Formen gefunden.

Bei den Ra-Mutanten fehlt nur die O-Kette, und das Kernpolysaccharid ist komplett vorhanden. Die Mutanten mit inkompletten Kernpolysacchariden werden als Rb-, Rc-, Rd- und Re-Lipopolysaccharide bezeichnet. Im Gegensatz zum kompletten Ra-Kern (core) mit 10 bis 11 Monosacchariden besteht der Kernrest der Re-Form nur noch aus 3 Einheiten 2-Keto-3-Desoxyoctonsäure (KDO) (39, 129). Für die Isolation der Lipopolysaccharide der R-Form-Bakterien beschrieb Galanos 1969 die Phenol/Chloroform/Petroleum-Äther-Methode (36). Weil bei Versuchen mit R-Formen die gleichen biologischen Wirkungen (z.B. Pyrogenität) wie bei kompletten Lipopolysacchariden zu beobachten waren, konnte geschlossen werden, daß die Polysaccharidkomponente des "endotoxischen Komplexes" keine spezifische Rolle in der Endotoxizität übernimmt (127). Besonders mit der Re-Mutante von *Salmonella minnesota* (Stamm R 595), deren Glykolipid in der Zellwand nur noch 3 KDO-Einheiten und Lipoid A enthält, wurden viele Testungen durchgeführt.

Nachdem die Bedeutung des Lipoid A-Anteils für die endotoxische Wirkung geklärt worden war, konzentrierte sich das Forschungsinteresse auf die chemische Struktur des in der Region III gelegenen Bausteins der Lipopolysaccharide. Lipoid A ist über eine ketosidische Bindung an die 2-Keto-3-Desoxyoctonsäure (KDO) geknüpft. Durch Hydrolyse mit milder Säure kann diese Bindung gespalten und das Lipoid A aus jedem LPS isoliert werden (71). Bemerkenswert ist der vergleichsweise hohe Anteil von LPS in den Re-Mutanten, die mehr Lipoid A liefern als die Mutanten mit weniger defizientem Kernpolysaccharid (72).

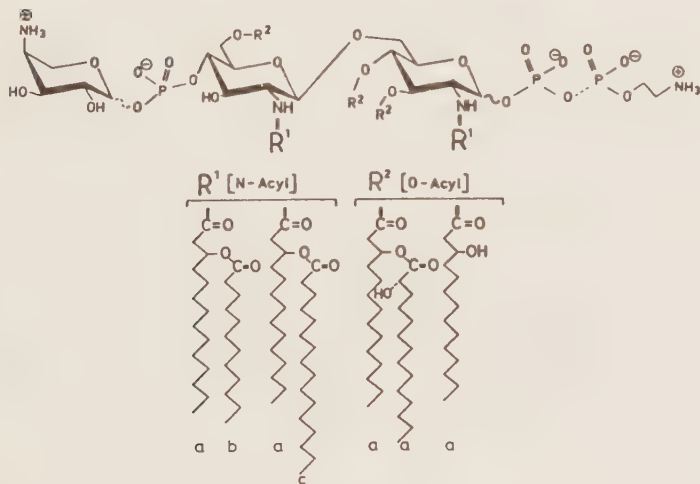
Die Lipoid A-Komponente weist anders als die O-Kette und auch das Kernpolysaccharid große strukturelle Ähnlichkeit bei verschiedenen gramnegativen Bakterien auf (28).

2.3. Chemische Struktur von Lipoid A

Wegen der weitgehenden Übereinstimmung im chemischen Aufbau wird als typisches Beispiel die Lipoid A-Komponente der Salmonellen erläutert. Für die Aufklärung des Lipoid A-Moleküls war es günstig, daß die Wasserlöslichkeit des zunächst unlöslichen Materials durch die Präparation aus elektrodialysierten Lipopolysacchariden erhöht werden konnte (38). H.-W. Wollenweber und Mitarbeiter isolierten Lipoid A aus der bereits erwähnten *Salmonella minnesota* Re-Mutante R 595 und stellten die Strukturformel, soweit sie bisher bekannt ist, graphisch dar (135).

In der übernommenen Abbildung ist die Zusammensetzung von Lipoid A aus einem Gerüst mit zahlreichen Substituenten zu sehen:

Abb. 2 Vorgeschlagene chemische Struktur von Lipoid A aus *Salmonella*-Lipopolysacchariden
(aus Wollenweber (135))



Das ungewöhnliche Phospholipid "Lipoid A" (im englischen Schrifttum "Lipid A" genannt) enthält ein zentrales Disaccharid aus zwei β -(1-6)-verknüpften D-Glucosamin(GlcN)-Einheiten, die jeweils mit einer Phosphatgruppe verbunden sind.

Die P-GlcN-GlcN-P-Region wird als Lipoid A-Rückgrat (backbone) bezeichnet (72, 128, 135). Das phosphorylierte Glucosamin-Disaccharid trägt langkettige Fettsäuren in Ester- und Amid-Bindungen. Die exakten Positionen der Fettsäuren, die eine Bedeutung für die Stärke der endotoxischen Aktivität haben, wurden noch nicht vollständig ermittelt. In der Abbildung 2 sind mit a, b und c Fettsäuren aus 12, 14 und 16 Carbonatomen im *Salmonella*-Lipopolysaccharid markiert (135).

Durch teilweise Substitution der Phosphatgruppen gibt es für Lipoid A auch wie bei den O- und Kern-Polysacchariden eine gewisse strukturelle Heterogenität. Die Analyse des Lipoid A-Bausteins bei verwandten Enterobacteriaceae führt zur gleichen zentralen Struktur, doch existieren Unterschiede der substituierten Fettsäuren (111). Die Variationen der estergebundenen Säuren überwiegen im Vergleich zu den amidgebundenen Substituenten. Bei der Untersuchung anderer gramnegativer Bakterien wurden jedoch auch Lipoid A-Strukturen gefunden, die sich grundsätzlich von denen der meisten Enterobacteriaceae unterscheiden. So sind beim Lipoid A von *Rhodopseudomonas viridis* und anderen Arten, denen die endotoxischen Eigenschaften fehlen, statt Phosphat und Glucosamin nur Glucosaminderivate mit neuen Substituenten vorhanden (72, 128).

Die chemische Struktur der Lipoid A-Komponente aus LPS von *Vibrio cholerae* weist ebenfalls deutliche Differenzen zu Enterobacteriaceae auf (15). Ungewöhnliche Lipoid A-Typen wurden aus *Pseudomonas paucimobilis* und *Pseudomonas aeruginosa* isoliert (62, 114). Lipoid A von *Acinetobacter calcoaceticus* aus der Familie der Neisserien besitzt andere

Strukturmerkmale als die Enterobakterien, ist diesen allerdings in den toxischen und biologischen Eigenschaften ähnlich (9, 10, 11). Bei *Rhodomicrobium vannielii* wurde ein Glucosamingerüst im Lipoid A gefunden, ohne daß Phosphatgruppen daran gebunden sind (52). Vergleichende Untersuchungen galten den Lipoid A-Komponenten anaerober Bakterien (21).

Wichtig für die Konformation des Lipoid A-Anteils sind die Umgebungsbedingungen für die Bakterien. So ändert sich bei niedriger Temperatur das Muster der gebundenen Fettsäuren, wie es zum Beispiel für Lipopolysaccharide der *Salmonella*-Spezies nachgewiesen wurde (136).

Die Studien zur Analyse des Lipoid A sind von großem Interesse für die Klärung der Frage, welche Molekülbestandteile für die endotoxischen Wirkungen verantwortlich sein könnten. Aus *Salmonella typhimurium* wurde nur einfach phosphoryliertes Lipoid A hergestellt, das keine endotoxischen Eigenschaften mehr hatte. Dieser Befund stützte die früher geäußerte Vermutung, daß die Entfernung einer Phosphatgruppe die Toxizität des Lipoid A senkt (97). Viele Untersuchungen befaßten sich in den vergangenen Jahren mit der Biosynthese des Lipoid A und seiner Vorstufen sowie der Stellung des Lipoid A in der Zellmembran (95, 117, 118). Aktuelle Studien vergleichen die Eigenschaften synthetisch produzierter Lipoid A-Analoga mit natürlichem Lipoid A (60, 138). Damit sollen die für die biologischen Aktivitäten wichtigen Determinanten im Lipoid A-Molekül bestimmt werden (104).

Erst 1983 beschrieben H. Brade und Galanos ein neues, bei verschiedenen gramnegativen Bakterien zu findendes Antigen in der core-Region der Lipopolysaccharide, das nicht bei Re-Mutanten anwesend ist und sich sowohl von Lipoid A als auch den bekannten R-Spezifitäten unterscheidet (12).

Nach der Aufklärung der chemischen Struktur von Lipoid A ist es möglich geworden, durch die sehr sensitive Gaschromatographie die Fettsäuren des Lipoid A zu messen und mit dieser einfachen Methode den Gehalt gramnegativer Bakterien in Sedimenten abzuschätzen (96).

2.4. Biologische Aktivitäten von Lipoid A

Bei der Erforschung der Endotoxine stellten Westphal und Lüderitz bereits 1954 die Vermutung auf, daß Lipoid A den biologisch aktiven Teil der Lipopolysaccharide repräsentiert (126). Untersuchungen mit inkompletten Lipopolysacchariden aus R-Form-Bakterien zeigten die gleichen endotoxischen Wirkungen wie komplette Lipopolysaccharide (71). Nachdem geklärt worden war, daß die O-Polysaccharide und Teile des Kernpolysaccharids für den Ausdruck der Endotoxizität nicht von Bedeutung waren, konnte der direkte Beweis für die biologische Aktivität des Lipoid A erst mit der Verfügbarkeit der Lipoidkomponente in reiner und löslicher Form geführt werden (40). Für biologische Testungen wurden wasserlösliche Komplexe aus Lipoid A und reinem Rinderalbumin gebildet (101). Die von Galanos, Rietschel und Lüderitz gesammelten Angaben über endotoxische Reaktionen auf Komplexe aus Lipoid A und Rinderalbumin (BSA) veröffentlichte Westphal in seiner Übersicht 1975 (127):

Tabelle 1 Endotoxische Reaktionen auf Lipoid A

Pyrogenität

Letale Toxizität

Erhöhte Toxizität durch Adrenalektomie

Erhöhte Toxizität durch BCG-Vorbehandlung

Shwartzman-Phänomen

Knochenmarksnekrosen

Embryonale Knochenresorption

Leukopenie

Leukozytose

Blutdruckabfall

Fortsetzung von Tabelle 1

Tumornekrotische Aktivität

Verstärkte Hautreaktion auf Adrenalin

Adjuvanswirkung (z.B. bei Liposomen (4))

Mitogene Lymphozytenstimulation

Induktion der IgG-Synthese bei neugeborenen Mäusen

Makrophagenaktivierung

Induktion des colony-stimulating factor aus Makrophagen

Komplementaktivierung

Aktivierung des Hagemann-Faktors

Induktion des Plasminogen-Aktivators

Induktion der Prostaglandinsynthese

Induktion der Interferonproduktion

Unspezifische Resistenz gegen Infektion

Früher Refraktärzustand gegen Endotoxin-Pyrogenität

Induktion von Endotoxintoleranz

Limulus-Amöbozytenlysat-Aktivierung

In einer neueren Zusammenstellung fügte Galanos 1977 dieser Liste noch einige weitere Eigenschaften von Lipoid A hinzu (43):

Plättchenaggregation

Induktion des tumornekrotisierenden Faktors

Induktion der Leber-Pyruvatkinase von Mäusen

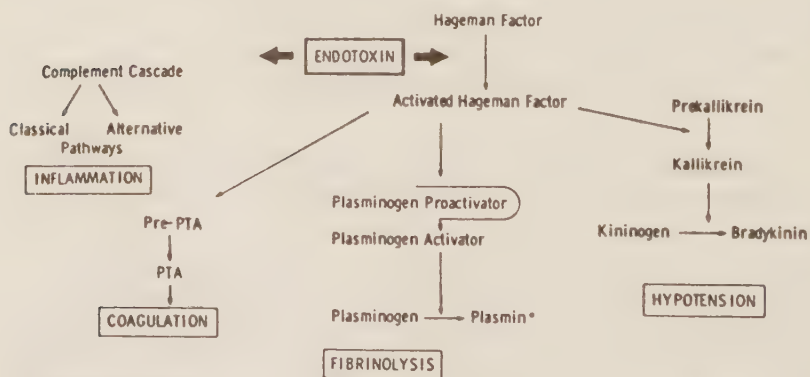
Inhibition der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase u.a.

Die gleichen endotoxischen Reaktionen, die mit der freien Lipoid A-Komponente hervorgerufen werden, sind auch durch die Verwendung reinen Lipopolysaccharids aus Enterobakterien zu erzielen (129). Präparation und Eigenschaften eines standardisierten Lipopolysaccharids aus *Salmonella abortus equi* wurden ausführlich beschrieben (42). E. Kenedi et al. bestätigten 1982 mit Experimenten bei Ratten die Bedeutung des Lipoid A-Anteils als einzige pyrogene Fraktion

im Endotoxin (LPS), fanden aber heraus, daß die Stärke der Pyrogenität von der Integrität des Lipopolysaccharidmoleküls abhängt. Weil die Pyrogenität des kompletten Endotoxins um ein Vielfaches über der von isoliertem Lipoid A lag, formulierten sie die Hypothese, daß die Funktion der Polysaccharidkomponente im Hinblick auf Lipoid A nicht allein als Träger der Löslichkeit zu sehen sei (64).

Die nächste Abbildung, die L.S. Young 1985 in einer Abhandlung über die gramnegative Sepsis publizierte (142), verdeutlicht die komplexen biologischen Effekte der Endotoxine (Lipopolysaccharide) gramnegativer Bakterien und ihre enge Verknüpfung. Zu den pathophysiologischen Wirkungen gehören die Aktivierung des Komplementsystems, der Gerinnung, aber auch des fibrinolytischen Systems. Ferner werden enzymatische Reaktionen angeregt, die über die Freisetzung von Bradykininen oder anderen vasoaktiven Peptiden zu Blutdrucksenkungen führen.

Abb. 3 Biologische Effekte von Endotoxinen gramnegativer Bakterien (aus Young (142))



* Can also activate complement

PTA = Plasma Thromboplastin Antecedent

Das breite Feld der biologischen Wirkungen bei Lipopolysacchariden bzw. Lipoid A bietet viele interessante Fragestellungen. So wurde die Interaktion von Lipopolysacchariden und Lipoid A mit Komplement untersucht, woraus sich ergab, daß der Aggregationszustand der Lipopolysaccharide ihre antikomplementäre Aktivität wesentlich beeinflußt (32, 131). Nachgewiesen wurde die Rolle von HDL (High-Density-Lipoprotein) als Transportprotein für Lipopolysaccharide im Plasma (33); dabei erhöht die Disaggregation der LPS ihre Bindung an HDL (90). Mit in vivo-Testungen werden ebenfalls die Interaktionen von Lipopolysacchariden und Blutplättchen behandelt (70, 79).

Noch nicht genau bekannt sind die Zusammenhänge der endotoxischen Wirkungen mit den Prostaglandinproduktionen von Makrophagen. Es wird angenommen, daß nach der Invasion von Toxinen wie Lipopolysacchariden die Aktivierung von Zellen des retikuloendothelialen Systems eine Freisetzung biologisch aktiver Mediatoren bewirkt. Dabei scheinen die Prostaglandine für die Vermittlung der Effekte von Lipoid A besonders wichtig zu sein, was auch daran abzulesen ist, daß einzelne Wirkungen der LPS durch Prostaglandininhibitoren wie Acetylsalicylsäure oder Indometacin blockiert werden können. Wahrscheinlich verschieben die LPS das Muster der von Makrophagen synthetisierten Prostaglandine (106).

Aktuelle Untersuchungen über Auswirkungen von Lipoid A auf das zelluläre Abwehrsystem beschäftigen sich mit der Granulozytenaktivierung durch Endotoxin (19, 20), der Wechselwirkung mit Makrophagen (85) oder der Stimulation von T-Lymphozyten durch Lipoid A (88) und der möglichen Zusammenarbeit von T- und B-Zellen bei der in vivo-Produktion von anti-Lipoid A-Antikörpern (87) und anti-LPS-Antikörpern (48). Die erst zu Beginn der siebziger

Jahre aufgedeckte Bildung von spezifischen Antikörpern gegen Lipoid A als Antigen (37) wird im nächsten Abschnitt ausführlich besprochen.

In vergleichenden Studien wurde gefunden, daß sich die biologischen Eigenschaften und die Lipoproteinbindung von extrahierten und nativen Lipopolysacchariden aus *Salmonella typhimurium* gleich verhalten (91). Mutationen der LPS spielen eine Rolle bei der Pathogenese der *Salmonella*-Gastroenteritis (86). Nachdem die endotoxischen Wirkungen der Enterobacteriaceae aufgeklärt waren, widmeten sich viele Arbeitsgruppen der Untersuchung biologischer Aktivitäten anderer gramnegativer Bakterien (z.B. 3, 41, 59). Den chemischen Strukturdivergenzen der Lipoid A-Komponenten entsprechend stimmten die Wirkungen der LPS nur zum Teil überein. So besitzen Rhodospirillaceae ein nicht-toxisches Lipopolysaccharid mit allerdings anti-komplementärer Aktivität (41).

Einen umfassenden Überblick der humoralen und zellulären Wirkungsweisen von Lipopolysacchariden und Lipoid A mit zahlreichen Literaturverweisen publizierte Fink in zwei Arbeiten 1981 (28, 29). Die Endotoxinämie hat auch für die Genese des akuten Nierenversagens bei Sepsis oder Leberzirrhose pathophysiologische Bedeutung. Nach Injektion von Endotoxin zeigten sich experimentell eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität und Verkleinerung des Zirkulationsvolumens als prärenale Faktoren (137). Über eine Aktivierung des sympathiko-adrenergen Systems führt Endotoxin auch zu Veränderungen im Fettstoffwechsel u.a. mit Erhöhung der freien Fettsäuren (54). Schon 1960 wurde gezeigt, daß Bestandteile des retikuloendothelialen Systems für die Inaktivierung von Endotoxin verantwortlich sind und in Organen wie der Niere mit einem nur geringen Anteil retikuloendothelialen Gewebes kaum eine Detoxifikation nach Injektion von Endotoxin eintritt (133).

Absorptionsstudien führten zu der Hypothese einer permanenten, aber wechselnd starken Aufnahme von Endotoxin aus dem Gastrointestinaltrakt, durch die möglicherweise das RES stimuliert wird. Für die Anhäufung biologisch aktiven Endotoxins bei Versuchstieren mit hämorrhagischem Schock sollte die Ursache aber weniger in einer erhöhten Absorption von Endotoxin aus Darmbakterien als in einer Abnahme der entgiftenden Fähigkeiten des RES liegen (98). In vergleichenden Untersuchungen ergab sich, daß die Elimination von S-Formen gramnegativer Bakterien langsamer als die der R-Mutanten geschieht. Dieser Befund wies auf die Bedeutung des bei den R-Formen besser zugänglichen Lipoid A-Anteils bei der Interaktion von Bakterien mit phagozytierenden Zellen hin (50). In der bereits erwähnten Arbeit über Komplexe von Lipopolysacchariden mit HDL (33) wurde bestätigend die schnellere Auflösung von R-Form LPS-Komplexen in Gegenüberstellung zu den Komplexen mit S-Formen gefunden. Zur näheren Betrachtung der Eliminationsabläufe wurde die unterschiedliche Verteilung von Endotoxin in Leber, Lunge und Niere mit immunhistochemischen Verfahren dargestellt. Nach Injektion erschienen die Lipopolysaccharide schnell in der Leber, phagozytiert von Kupfferschen Sternzellen und Granulozyten. R-Form-LPS wurden auch in Hepatozyten gefunden. Erst später waren die LPS in der Lunge zu entdecken, wobei die LPS-tragenden Zellen aus dem RES (Leber!) in die Lunge transportiert worden sein könnten. In den Nieren waren nach intravenöser Applikation von LPS nur sehr geringe Mengen zu messen; es ist demnach unwahrscheinlich, daß die Lipopolysaccharide über die Niere ausgeschieden werden. Eher werden die Ausscheidungsprodukte der LPS über die Galle in den Darm sezerniert (34). Die Verteilung der Lipopolysaccharide auf verschiedene Gewebe wird auch von der Zusammensetzung der O-Ketten des Polysaccharid-Anteils beeinflusst (55).

3. Antikörper gegen Lipoid A

Lange Zeit war die Immunogenität der Lipopolysaccharide allein dem Polysaccharid-Anteil zugeordnet worden, bevor auch die Bildung von Antikörpern gegen die Lipoid A-Komponente nachgewiesen werden konnte. Die Antikörper gegen die O- und R-Antigene sind wegen der großen Strukturdivergenzen der Polysaccharidkomponenten gramnegativer Bakterien als speziesspezifisch zu betrachten und dienen der Klassifikation der Bakterien (72, 127).

Chris Galanos, Otto Lüderitz und Otto Westphal identifizierten 1971 erstmals spezifische Antikörper gegen Lipoid A im Serum von Kaninchen (37). Für die Immunisierung wurden auf der Zelloberfläche dicht mit Lipoid A beladene Bakterien eingesetzt. Die Bestimmung der anti-Lipoid A-Aktivitäten erfolgte mit einem passiven Hämolysetest unter Verwendung von mit Lipoid A vorbehandelten und dadurch sensibilisierten Erythrozyten (zur Technik des Hämolysetests siehe auch E. Neter, 1956 (92, 93)). Wie die Experimente zeigten, ist die Stärke der Antikörperbildung von der ausreichenden Exposition des Lipoid A-Antigens abhängig.

Bemerkenswert und wegweisend für die zukünftigen Untersuchungen war die Feststellung von Kreuzreaktionen der Lipoid A-Komponenten von Salmonella- und Escherichia coli-Stämmen. Der chemischen Strukturähnlichkeit des Lipoid A-Moleküls bei verschiedenen gramnegativen Bakterien zufolge führten die als "gruppenspezifisch" zu bezeichnenden Lipoid A-Antikörper zu Antigen-Antikörper-Reaktionen bei diversen Lipopolysacchariden. Die Studien wurden auf viele gramnegative Mikroorganismen ausgedehnt und positive serologische Kreuzreaktionen für alle Enterobacteriaceae ermittelt. Überraschend war, daß anti-Lipoid A-Antiserum aus Enterobakterien (Salmonella) auch mit einigen aus taxonomischer Sicht weit von den Enterobacteriaceae ent-

fernt liegenden gramnegativen Photosynthesebakterien reagierte (z.B. *Rhodopseudomonas gelatinosa*). Die fehlende Kreuzreaktion anderer Rhodospirillaceae wird dadurch erklärt, daß sich deren Lipoid A-Komposition deutlich vom chemischen Aufbau des Lipoid A der Enterobakterien unterscheidet (41). Mit den Kreuzreaktionen für Lipoid A können also auch Strukturähnlichkeiten oder -differenzen in der Komposition des Lipoid-Anteils der LPS vermutet werden (40). Die kleinen Inhomogenitäten im Lipoid A-Aufbau der Enterobacteriaceae beeinflussen deren serologische Kreuzreaktionen untereinander jedoch nicht negativ. Mögliche protektive Effekte der anti-Lipoid A-Antisera wurden zunächst in Tierexperimenten untersucht. N.A. Mullan et al. konnten mit Antiserum gegen Lipoid A von *Salmonella minnesota* R595 keinen Schutzeffekt bei Kaninchen gegen gramnegative Bakterien erhalten und stellten in Frage, ob es sich bei dem in anderen Studien mit verschiedenen Antiseren kreuzreagierenden Antigen, das für eine Schutzwirkung verantwortlich erschien, wirklich um Lipoid A handelte (89). E.T. Rietschel und Galanos zeigten aber den antiendotoxischen Einfluß von Lipoid A-Antiserum unter bestimmten Versuchsbedingungen. Wenn die Versuchstiere vor der Inkubation mit Antiserum durch eine Injektion von Lipoid A vorbehandelt worden waren, blieben - abhängig von der Menge des übertragenen Antiserums - die Lipoid A- bzw. LPS-induzierte pyrogene Wirkung und die lokale Schwartzman-Reaktion (Hautnekrosen) aus (103). Durch Versuche mit anderen Pyrogenen als Endotoxin bewiesen Rietschel und Lüderitz, daß die Schutzwirkung von anti-Lipoid A-Antiserum endotoxinspezifisch ausfällt und sich nur gegen das von Endotoxin bzw. Lipoid A induzierte Fieber nutzen läßt (102). 1973 hatte Rietschel zusammen mit Y.B. Kim, D.W. Watson und anderen die Pyrogenität und Immunogenität an Lipoid A-Konjugaten mit Albumin

(BSA = bovine- und HSA = human serum albumin) untersucht und auf die Bildung spezifischer Lipoid A-Antikörper als Ursache der induzierbaren "Pyrogentoleranz" geschlossen (101). Da die protektive Wirkung von Lipoid A-Antiserum nur an mit LPS oder Lipoid A vorbehandelten Tieren zu beobachten war, vermuteten sie neben den humoralen Faktoren die Beteiligung anderer, zum Beispiel zellulärer Mechanismen an der Endotoxin-(Kreuz-)Immunität. G.G. Greer und Rietschel stellten fest, daß die Hypothermie-Antwort nach Lipoid A-Injektion bei Mäusen je nach dem Abstand von einer LPS-Vorbehandlung unterschiedlich ausfiel. Zwischen einer frühen und späten Toleranzphase mit fehlender Hypothermie-Reaktion auf LPS bzw. Lipoid A lag eine hypersensitive Phase mit verstärkter Hypothermie-Antwort. Als Grundlage des Toleranzphänomens wurden Mechanismen angenommen, die die Prostaglandinfreisetzung hemmen; die Beteiligung spezifischer humoraler Faktoren (= Antikörper) gegen Lipoid A bei der Vermittlung der LPS-induzierten Toleranz ist zu diskutieren (44). In einer anschließenden Untersuchung wurde belegt, daß die erhöhte oder erniedrigte Empfindlichkeit gegenüber dem letalen Effekt der LPS ebenfalls vom Zeitpunkt der LPS-Vorbehandlung und der verwendeten Dosis abhängt. Überraschenderweise verhalten sich die Hyperreaktivität und Toleranz in ihrer zeitlichen Staffelung bezüglich der Parameter Hypothermie und Letalität genau entgegengesetzt (45).

Für die biologischen Aktivitäten der spezifisch gegen das toxische Prinzip der Lipopolysaccharide gerichteten Lipoid A-Antikörper sind neben schützenden auch schädliche Reaktionstypen zu erwarten. Hypothesen über die schädigende Wirkung von Antikörpern gegen Lipoid A entwickelte M. Westenfelder aus seinen Versuchen mit Lipoid A-Injektionen in das Nierenbecken von Hunden verschiedenen Alters. Bei erwachsenen Hunden persistierte das injizierte Lipoid A im Nierengewebe und führte zu histologischen Veränderungen im Sinne einer interstitiellen Nephritis. Da gleichzeitig im Serum dieser

Tiere mit dem passiven Hämolysetest Lipoid A-Antikörper bestimmt werden konnten, ist anzunehmen, daß eine pathologische Immunreaktion die abakterielle Nephritis auslöst. Der Injektion von Lipoid A bei Welpen folgte jedoch weder eine interstitielle Nephritis noch die Bildung von Lipoid A-Antikörpern, womit die mögliche Bedeutung der Lipoid A-Antikörper für die Nierenschädigung gestützt wird. Wichtig für die Aussagen über den Einfluß einer pathologischen immunologischen Komplexbildung aus Lipoid A-Antigen und Antikörpern waren vergleichende Untersuchungen an Hunden, die vor der Nephritisentwicklung in unterschiedlichem Ausmaß mit Lipoid A präimmunisiert worden waren. Daraus ergab sich, daß die Ausprägung der Nierenentzündung mit der Fähigkeit der Versuchstiere zur immunologischen Antwort, das heißt zur Antikörperbildung gegen Lipoid A korreliert (120, 122, 123). Durch diese Beobachtung rückten die Lipoid A-Antikörper als pathogenetischer Faktor bei Harnwegsinfektionen in den Blickpunkt des Interesses der klinischen Forschung. Da bei Harnwegsinfektionen durch gramnegative Bakterien Endotoxin bzw. Lipoid A freigesetzt wird, war das Auftreten von Lipoid A-Antikörpern im Serum von Erkrankten zu erwarten. Lipoid A-Antikörper wurden mit dem bereits erwähnten passiven Hämolysetest bei Patienten mit Harnwegsinfektionen untersucht und die daraus abzuleitenden Thesen diskutiert (112, 121, 124).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Lipoid A-Antikörper mit einer neuen Labormethode, dem ELISA (= enzyme-linked immunosorbent assay), bei Patienten mit Harnwegsinfektionen oder Pyelonephritis, aber auch bei Sepsiskranken u.a. bestimmt. In den folgenden Abschnitten werden die Methodik des ELISA und die Versuchsergebnisse beschrieben. Die Diskussion der Ergebnisse greift die oben angeführten Betrachtungen zur Bedeutung der Lipoid A-Antikörper wieder auf.

4. Methodik der Antikörperbestimmung mit ELISA

4.1. Allgemeines über den Enzymimmunoassay

Enzymimmunoassays (EIA) beruhen auf dem gleichen Prinzip wie Radioimmunoassays (RIA), doch werden die nachzuweisenden Substanzen dabei mit einem Enzym anstelle eines radioaktiven Isotops markiert. Vorteile des Enzymimmunoassays sind die Stabilität der Reagenzien gegenüber der kurzen Halbwertszeit der Radioisotope und die erleichterte Praktikabilität durch den Verzicht auf radioaktive Reagenzien, die damit verbundenen teuren Zähleinrichtungen und die speziellen Sicherheitsmaßnahmen.

Mit Enzymimmunoassays können sowohl Antikörper als auch Antigene nachgewiesen werden. Sie werden deshalb in zunehmender Zahl zur Diagnostik infektiöser Krankheiten auf den Gebieten der Bakteriologie, Virologie und Parasitologie angewendet, aber auch zur Bestimmung von Hormonen und Serumproteinen genutzt.

4.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) zur Bestimmung von Antikörpern

Für die Bestimmung von Antikörpern mit Enzymimmunoassay wird gewöhnlich die Bezeichnung ELISA (= enzyme-linked immunosorbent assay) gewählt. Den ELISA entwickelten 1971 unabhängig voneinander die Arbeitsgruppen von E. Engvall und P. Perlmann (23) und von B.K. van Weemen und A.H.W.M. Schuurs (115). Mit den inzwischen zur Verfügung stehenden automatisierten Geräten werden ELISA-Bestimmungen einfach, sicher und relativ preiswert durchgeführt. Gegenüber anderen serologischen Labormethoden zum Antikörpernachweis hat der ELISA auch den Vorzug hoher Sensitivität und Spezifität (25, 132).

Bei den vorliegenden Untersuchungen erfolgte die Bestimmung der Lipoid A-Antikörper mit einem nicht-kompetitiven ELISA vom sandwich-Typ. Das Lipoid A-Antigen ist an die feste Phase gebunden, die mit dem Antigen reagierenden Lipoid A-Antikörper werden mit einem enzymmarkierten anti-human Immunglobulin dargestellt und die anschließende Substratreaktion mit einem Farbumschlag photometrisch gemessen (108, 132). Den Reaktionsverlauf dieses indirekten Enzymimmunoassays verdeutlicht schematisch die Abbildung 4.

Abb. 4 Schematischer Ablauf des nicht-kompetitiven ELISA vom sandwich-Typ



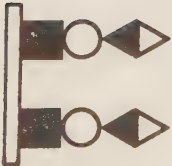
Antigen

Antigen-Adsorption
an die feste Phase
(Küvettenwand)



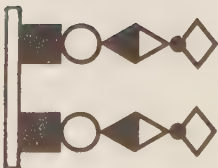
Antikörper

Zugabe von Serum -
Bindung spezifischer
Antikörper an das Antigen



Enzymkonjugat

Zugabe von enzymmarkiertem
Anti-Immunglobulin -
Bindung des Enzymkonjugats
an die Antikörper



Substrat

Zugabe von
Substrat -

Verfärbung
durch enzyna-
tische Spaltung

Photometrische
Messung der
Reaktion

4.3. Detaillierte Beschreibung des ELISA für Lipoid A-Antikörper

Die Versuchsgestaltung richtete sich nach den Empfehlungen von Engvall (24) und B. Carlsson (18) und wurde nur wenig modifiziert. Auch andere Untersucher benutzten die ELISA-Methode nach Engvall zur Bestimmung von Lipoid A-Antikörpern (80, 81). Für den Test wurde ein Mikro-ELISA-Analysator PR 50 (Gilford-Instruments, Düsseldorf) eingesetzt, bei dem die von einem Mikroprozessor gesteuerten Arbeitsschritte frei gewählt werden können. Zu diesem System gehören Plastikküvetten (Polystyrol) mit einem Arbeitsvolumen von 250 µl und einer Schichtdicke von 1 cm, die als feste Phase zur Adsorption des Antigens dienen. 10 Küvetten sind zu einem Streifen zusammengefaßt, 5 Streifen bilden auf einer Kunststoffplatte eine Kassette ("Cuvette-Pak"). Mehrere Kassetten mit je 50 Küvetten können aneinandergereiht oder auch einzelne Küvettenstreifen von Kassetten heruntergenommen werden.

4.3.1. Material

4.3.1.1. Antigen

Alkalibehandeltes Lipoid A als Antigen stellte freundlicherweise Herr Dr.C. Galanos vom Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg zur Verfügung, der die Präparation von Lipoid A genau beschrieben hat (37):

Die Gewinnung von Lipoid A aus gramnegativen Bakterien vollzieht sich in mehreren Schritten. Zunächst werden die Lipopolysaccharide aus der Zellwand der gramnegativen Bakterien mit der Phenol/Wasser-Methode bei S(smooth)-Form-Bakterien (125) oder mit der Phenol/Chloroform/Petroleum-Äther-Methode bei R(rough)-Form-Bakterien (36) extrahiert. Durch Hydrolyse der Lipopolysaccharide in 1%iger Essigsäure bei 100°C für 2 h entsteht freies Lipoid A. Das freie, wasserunlösliche Lipoid A wird in

0,25 N Natronlauge bei 56°C für 1 h erhitzt und so das alkalibehandelte Lipoid A in löslicher Form hergestellt.

Das Lipoid A-OH befand sich in Gläschen mit einer Konzentration von 2 mg/ml; insgesamt wurden bei den Studien 6 Gläschen zu je 1 ml verarbeitet.

Für die Antigenbeschichtung der Küvetten mit Lipoid A in einer Konzentration von 5 mg/l wurden bei jedem Versuch die berechneten Lipoid A-Mengen mit sterilen Pipetten aus den Gläschen entnommen und im Verhältnis 1:400 in Phosphatpuffer verdünnt.

4.3.1.2. Pufferlösungen

Die Pufferlösungen zum Verdünnen der Reagenzien und zum Waschen der Küvetten wurden im Labor angesetzt und etwa alle 2 Wochen erneuert.

Der Phosphatpuffer (PBS = phosphate buffered saline, 0,01 mol/l, pH eingestellt auf 7,3) erhielt stets 0,02 % Natriumazid als konservierenden Zusatz (0,2 g/l = 3 mmol NaN_3 /l PBS) und wurde bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Sämtliche Waschvorgänge erfolgten wie die Verdünnung der Seren und des Enzymkonjugats mit PBS-Tween (0,01 mol/l PBS + 0,05 % Tween 20 + 0,02 % NaN_3). 0,5 ml Tween 20 (= Polyoxyäthylensorbitanmonolaureat, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Art. 822184) pro Liter Pufferlösung sollen unspezifische Adsorptionen vermeiden (24).

Der zum Verdünnen des Substrats benötigte Diethanolaminpuffer (1,0 mol/l, pH eingestellt auf 9,8, mit Zusatz von 0,00024 mol/l MgCl_2) wurde bei 4°C gelagert.

4.3.1.3. Serumproben (Antikörper)

Die zu untersuchenden Serumproben stammten von Patienten der Kinderklinik.

Nach Gerinnen des Blutes in Röhrchen ohne Zusatz chemischer Substanzen wurden die Proben zentrifugiert, der überstehende Serumanteil in Mengen bis zu 1 ml in "Plastikhütchen" (Firma Eppendorf) eingefüllt und bei -20°C eingefroren. Die Verweildauer der Seren im Tiefkühlschrank bis zur Antikörpertestung war unterschiedlich lang und reichte von wenigen Tagen bis zu einem Jahr. Die Antikörper-Aktivitäten sollen durch die nicht zu langen unterschiedlichen Aufbewahrungszeiten nicht beeinflusst werden (1).

Für jeden Versuch wurden die ausgewählten Serumproben aufgetaut und nach Entnahme der erforderlichen Serummenge wieder eingefroren. Waren zuerst die IgG-Antikörper gegen Lipoid A bestimmt worden, wurden die gleichen Seren zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal für die Bestimmung der IgM-Antikörper aufgetaut. Zu einem großen Teil fanden die Serumtestungen auf IgG- und IgM-Antikörper an einem Tag mit nur einmaligem Auftauen der Seren statt.

4.3.1.4. Enzymkonjugat

Als Enzymkonjugat wurde mit alkalischer Phosphatase gekoppeltes anti-human Immunglobulin der Klassen IgG und IgM benutzt. Die spezifischen Immunglobuline stammten aus dem Serum von Ziegen (anti-human IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma Chemie, Taufkirchen, No. A 3150; anti-human IgM alkaline phosphatase conjugate, Sigma Chemie, Taufkirchen, No. A 3275). Die Enzymkonjugatlösungen wurden bei 4°C im Kühlschrank aufgehoben und für die Versuche in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung von 1:1000 in PBS-Tween eingesetzt.

4.3.1.5. Substrat

Für den Lipoid A-Antikörpernachweis mit ELISA diente p-Nitrophenylphosphat (NPP, Sigma Chemie, Taufkirchen, No. 104) als Substrat. Das kristalline p-Nitrophenylphosphat wurde bei -20°C dunkel gelagert und erst unmittelbar vor Gebrauch mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Diethanolaminpuffer aufgelöst.

4.3.2. Versuchsablauf

Die Plastikküvetten wurden mit jeweils 250 μl der Lipoid A-Antigenlösung (Konzentration 5 mg/l) beschichtet und 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend standen die Küvetten mit der Antigenlösung mindestens für eine Nacht bei 4°C im Kühlraum. Vor der Serumzugabe wurden die Antigenlösung abgesaugt und die Küvetten mit 0,5 %iger Rinderalbuminlösung (BSA = bovine serum albumin, Sigma Chemie, Taufkirchen, No. A 4503, verdünnt in PBS) nachbeschichtet, um noch freie Plätze auf den Küvetten zu besetzen und eine unspezifische Bindung an diesen Stellen zu verhindern (27). Die Inkubation mit BSA bei 37°C dauerte 45 Minuten. Die Küvetten wurden dann 3mal mit PBS-Tween gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschvorgängen verblieb die Waschlösung für 3 Minuten in den Küvetten.

Die während der Nachbeschichtung aufgetauten Seren mit den nachzuweisenden Lipoid A-Antikörpern wurden in mehreren Verdünnungsstufen getestet. Die Versuche der Phase I (Einzeltestungen) umfaßten 5 Verdünnungen ($1:10$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$), während in der Phase II (Verlaufstestungen) nur noch 2 Verdünnungen ($1:10$, $1:10^2$) der Seren in PBS-Tween angesetzt wurden. Für jede Verdünnung waren 3 Parallelansätze vorgesehen, so daß pro Serum 15 Küvetten in

Phase I und 6 Küvetten in Phase II benötigt wurden. Ein Versuch beinhaltete die Testung von etwa 15 bis 25 Seren in Phase I und 30 bis 45 Seren in Phase II. Zusätzlich wurden bei jedem Versuch 10 Küvetten als Leerwerte nicht mit Serum gefüllt, sondern nur mit Antigen und Substrat sowie in 3 von 10 Küvetten mit Enzymkonjugat beschichtet.

Der Serumverbrauch betrug 100 μ l je Testung. Bei einer Grundverdünnung von 1:10 in PBS-Tween konnten daraus 3 x 250 μ l für den Parallelansatz mit der höchsten Serumkonzentration gewonnen und 100 μ l für die weitere Verdünnung verwendet werden.

Auf das Anlegen der Verdünnungsreihen mit dem zum ELISA-Analysator gehörenden automatischen Verdünnungsgerät (Gilford) folgte das manuelle Pipettieren der Serumproben in die Küvetten und eine Inkubation der Antikörperseren über 5 Stunden bei Zimmertemperatur.

Mit erneutem dreimaligem Waschen der Küvetten in PBS-Tween begann der nächste Arbeitsschritt, das Einfüllen von je 250 μ l der IgG- oder IgM-Enzymkonjugatlösung in einer Verdünnung von 1:1000 mit PBS-Tween.

Die Küvetten blieben über Nacht bei Zimmertemperatur stehen und wurden nach einer Inkubationszeit von etwa 16 Stunden wieder dreimal gewaschen.

Die Substratreaktion wurde mit der Zugabe der farblosen p-Nitrophenylphosphatlösung (1 mg/ml in Diethanolaminpuffer) eingeleitet. Das Enzym alkalische Phosphatase hydrolysiert das substratgebundene Phosphat und setzt gelbes p-Nitrophenolat frei. Der Farbumschlag der Lösungen trat in den Küvetten zum Teil schon nach wenigen Minuten ein, während bei anderen Proben auch nach längerer Reaktionszeit keine Farbveränderung zu beobachten war. Die Reaktionszeit für den Nachweis der IgG-Antikörper wurde in Phase I der Versuche auf 60 Minuten und in Phase II

auf 30 Minuten bei 37°C festgelegt. Für IgM-Antikörper galt immer eine Reaktionszeit von 30 Minuten bei 37°C.

Die Enzymreaktionen wurden nach Ablauf der genannten Zeiten durch Zugabe von 50 µl 3 N Natronlauge gestoppt. Eine genaue Einhaltung dieser Zeiten für alle Küvetten war durch die automatische Einstellung der die Reaktion begrenzenden Füllvorgänge auf zeitliche Abstände von 1 Minute für die einzelnen Küvettenstreifen gewährleistet. Die Extinktionen des gelben Reaktionsproduktes wurden mit dem im ELISA-Analysator eingebauten Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen und digital mit Leuchtdioden angezeigt sowie in dem angeschlossenen Thermo-drucker mitgeschrieben. Nach der Eichung der mitgetesteten Leerwerte auf eine Extinktion von 0,050 wurden die Extinktionen aller Küvetten bestimmt und die ausgedruckten Werte im Versuchsprotokoll festgehalten.

Der exakte photometrische Bereich des Meßgerätes deckt Extinktionen von 0,000 bis 2,000 ab, doch gibt das Gerät auch Werte über 2,000 bis zu 2,830 an.

Dem Prinzip des ELISA zufolge ist die eintretende Farb-reaktion (farblos → gelb) mit der entsprechenden Extinktionsänderung ein Maß für den Antikörpergehalt des untersuchten Serums.

5. Versuchsreihen zur Lipoid A-Antikörperbestimmung

Die Versuche mit Testung von Patientenseren auf Lipoid A-Antikörper wurden wie im Abschnitt Methodik geschildert durchgeführt und dauerten aufgrund der langen Inkubationszeiten vom Beschichten der Küvetten mit Lipoid A-Antigenlösung bis zum Ausdruck der Extinktionen der Substratlösung immer zwei bis drei Tage.

Die antigenbeschichteten Küvetten wurden nach einer Kühlraumaufbewahrung von einem oder mehreren Tagen für die Versuche verwendet.

5.1. Vorversuche

5.1.1. Modifikation der Versuchsbedingungen

Nachdem in den ersten Versuchsreihen die Küvetten unmittelbar nach dem Absaugen und Auswaschen der Antigenlösung mit den Serumproben gefüllt worden waren, führten wir bald als Zwischenschritt die in der Literatur empfohlene Nachbeschichtung der Küvetten mit 0,5%iger Rinderalbuminlösung (Fink (27)) ein, mit der eine unspezifische Bindung von Antikörpern an freien Plätzen der Polystyrol-Oberfläche gehemmt werden soll.

Um den Effekt der Nachbeschichtung zu verifizieren, wurden in einem vergleichenden Versuch zwei Lipoid A-Antikörper enthaltende Seren mit diversen Modifikationen getestet und die Extinktionswerte der 5 Serumverdünnungsstufen graphisch dargestellt.

Neben dem Einsatz von Rinderalbumin testeten wir einen Wechsel der Enzymkonjugatkonzentration und der Temperatur der Substratreaktion.

In einem Parallelversuch wurden die Extinktionen der Seren "A" und "B" mit 6 verschiedenen Ansätzen bestimmt:

- 1) Ohne Nachbeschichtung mit Rinderalbuminlösung (BSA), Enzymkonjugatlösung 1:1000 verdünnt, Substratreaktion bei 37°C.
- 2) Ohne Nachbeschichtung, aber Enzymkonjugatlösung 1:500 statt 1:1000 verdünnt, Substratreaktion bei 37°C.

- 3) Ohne Nachbeschichtung, Enzymkonjugat 1:1000, aber Substratreaktion bei Zimmertemperatur statt standardisiert unter 37°C.
- 4) Nachbeschichtung mit 2% BSA direkt im Anschluß an fünfstündige Antigeninkubation, Enzymkonjugat 1:1000, Substratreaktion bei 37°C.
- 5) Nachbeschichtung mit 0,5% BSA direkt nach Antigeninkubation, Enzymkonjugat 1:1000, Substratreaktion bei 37°C.
- 6) Nachbeschichtung mit 2% BSA erst vor Zugabe der Antikörperseren (die Antigenlösung stand somit mindestens einen Tag in den Küvetten), Enzymkonjugatlösung 1:1000, Substratreaktion bei 37°C.

Die Seren wurden jeweils von 1:10 bis 1:10⁵ verdünnt. In der folgenden Graphik sind die Mittelwerte der dreifach pro Verdünnungsstufe gemessenen Extinktionen aufgetragen (Abb. 5 und Tabelle 2):

Abb. 5 Testung der Seren A und B mit 6 verschiedenen Ansätzen

○—○ = Serum A
●—● = Serum B

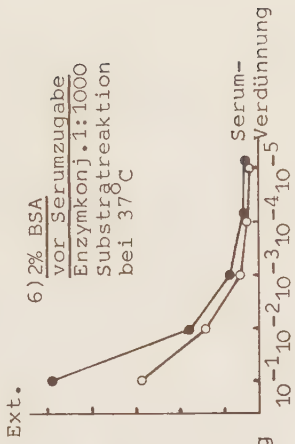
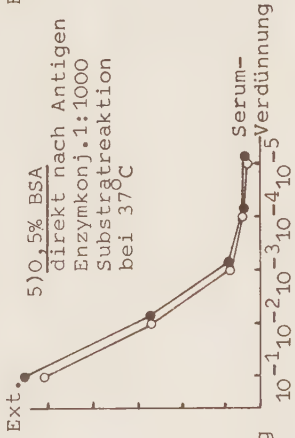
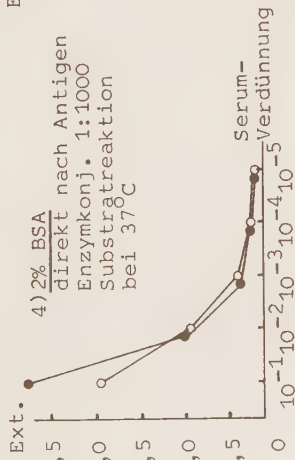
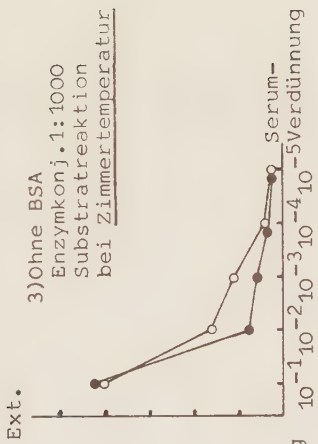
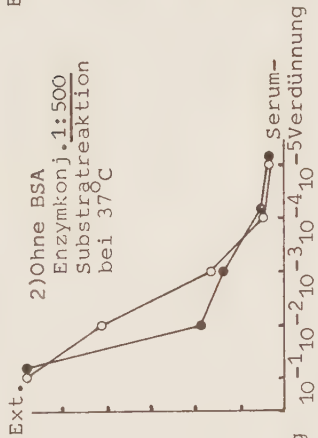
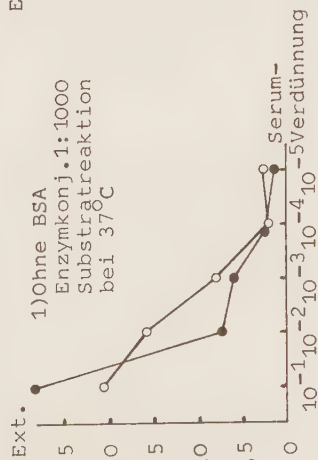


Tabelle 2 Testung der Seren A und B mit
6 verschiedenen Ansätzen

Extinktionswerte bei 5 Verdünnungsstufen
(jeweils Durchschnitt aus 3 Meßwerten)

		10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
<u>Serum A</u>						
Ansatz	1	0,245	0,185	0,788	1,580	2,034
	2	0,155	0,223	0,874	2,053	(2,830)
	3	0,082	0,160	0,526	0,815	2,015
	4	0,085	0,130	0,385	0,995	1,995
	5	0,098	0,173	0,448	1,347	(2,513)
	6	0,089	0,104	0,266	0,727	1,446
<u>Serum B</u>						
Ansatz	1	0,097	0,211	0,598	0,697	(2,725)
	2	0,156	0,246	0,695	0,944	(2,830)
	3	0,074	0,136	0,306	0,380	2,113
	4	0,084	0,139	0,329	1,017	(2,830)
	5	0,126	0,155	0,470	1,355	(2,830)
	6	0,111	0,148	0,460	0,881	(2,453)
		Leerwert: Extinktion 0,040				

(Zahlen in Klammern:
Mittelwert aus Zahlen
bis 2,830 = obere Meß-
grenze des Photometers)

5.1.2. Ergebnisse und Interpretation der Versuchs- modifikationen

Bei den Serumverdünnungen $1:10^4$ und $1:10^5$ liegen die Extinktionswerte in allen 6 Ansätzen in der Nähe der Leerwerte (dabei handelt es sich um Proben, denen kein antikörperhaltiges Serum zugesetzt wird) mit $E = 0,040$. Anstiege der Extinktionswerte sind ab $1:10^3$ zu verfolgen, wobei das Ausmaß des Anstiegs unter den verschiedenen Versuchsbedingungen erheblich differiert.

- In den Ansätzen ohne Nachbeschichtung (1 - 3) liegen die Extinktionen bei $1:10^3$ höher als bei Einsatz von Rinderalbuminlösung, die Kurvenwerte zu den Konzentrationstufen $1:10^2$ und $1:10$ scheinen weiter voneinander abzuweichen.
- Auch "ohne genaue Beweisführung" geben die Kurven unter 4 - 6 ein einheitlicheres, damit wahrscheinlich dem Antikörpergehalt eher entsprechendes Bild als 1 - 3.
- Unter der Vorstellung, daß BSA die unspezifische Bindung der anti-human Immunglobuline reduziert, sind die weniger hohen Extinktionswerte, die bei den Verdünnungen $1:10^3$ und zum Teil auch $1:10^2$ auffallen, als Ausdruck einer höheren Spezifität der Lipoid A-Antikörperbestimmungen bei Nachbeschichtung zu werten.
- Über die Extinktionswerte bei $1:10$ kann keine differenzierende Aussage getroffen werden, weil Werte über 2,0 nicht mehr im linearen Bereich des Photometers liegen und bei sehr starker Färbung immer der Endwert der Skala 2,830 ausgedruckt wird.
- Um eine ausreichende Besetzung der Haftstellen an Polystyrol-Küvetten zu gewährleisten, sollte die Nachbeschichtung mit BSA nicht unmittelbar nach der 5stündigen Inkubation mit Antigenlösung bei 37°C erfolgen, sondern erst vor der Fortsetzung des Versuches mit der Zugabe der antikörperhaltigen Seren einen oder mehrere Tage später.

In der Zwischenzeit könnten noch freie Valenzen der im Kühlraum gelagerten Küvetten durch die später ausgespülte Lipoid A-Antigenlösung abgedeckt werden.

Nach den dargestellten Ergebnissen der Vorversuche und theoretischen Erwägungen wurde die Nachinkubation mit Rinderalbuminlösung (0,5% BSA, Inkubationszeit 45 min bei 37°C) vor der Serumzugabe durchgeführt, wobei sich ein paralleler Arbeitsablauf der im wesentlichen maschinellen Nachbeschichtung mit der manuell anzulegenden Serumverdünnungsreihe anbot.

Der Vergleich der Enzymkonjugatverdünnungen von 1:1000 und 1:500 in den Ansätzen 1 und 2 erbrachte keine grundsätzliche Änderung des Kurvenverlaufs für die Seren "A" und "B". Es ist anzunehmen, daß mit der vom Hersteller empfohlenen Arbeitsverdünnung von 1:1000 bereits genügend anti-human Immunglobulinmoleküle enthalten sind, um die nachzuweisenden Lipoid A-Antikörper zu markieren. Würde eine relative Absättigung mit Enzymkonjugatmolekülen bei 1:1000 nicht bestehen, wären bei Einsetzen der Verdünnung 1:500 viel höhere Extinktionswerte zu erwarten gewesen.

Für die gesamten Versuchsreihen behielten wir also die Enzymkonjugatverdünnung von 1:1000 bei.

Die den ELISA abschließende Substratreaktion (siehe Abbildung 4/Methodik) führten wir bei 37°C im Wärmeschrank durch, um für diesen temperaturempfindlichen Schritt der enzymatischen Umsetzung vergleichbare Außenbedingungen von Versuch zu Versuch zu schaffen.

Wie der Vergleich der Ansätze 1 und 3 zeigt, verlief die Reaktion bei Zimmertemperatur deutlich schwächer; in der gleichen Inkubationszeit wurden weniger hohe Extinktionen erreicht. Bei der im Labor nicht gleichmäßig einstellbaren Raumtemperatur wären die Substratreaktionen durch die vorhandenen Temperaturschwankungen zwischen den einzelnen Versuchsreihen unterschiedlich beeinflusst worden.

5.2. Versuchsreihen mit Patientenserum

Die Testung der über mehrere Monate gesammelten Serumproben von ambulant oder stationär behandelten Patienten der Kinderklinik wurde in zwei Abschnitten durchgeführt. An die Phase I mit einer Querschnittsuntersuchung von je einem Serum pro Patient schloß sich in der Phase II die Verlaufsbeobachtung der Antikörpertiter über Tage und Wochen bei mehreren Serumproben eines Patienten an.

5.2.1. Querschnittsuntersuchung = Phase I

5.2.1.1. Patientengut der Querschnittsuntersuchung

Im ersten Abschnitt prüften wir bei 93 Kindern (43 Jungen, 50 Mädchen), deren Alter zwischen wenigen Wochen und 16 Jahren lag, eine Serumprobe auf Lipoid A-Antikörper. Von den 81 Kindern mit gramnegativen bakteriologischen Befunden waren 23 Kinder jünger als 3 Monate, die hauptsächlich an bakteriellen Trachealbesiedelungen und Sepsis litten. Älter als 10 Jahre waren 17 Kinder.

Die Kontrollgruppe mit Patienten ohne Infektion (Klinikaufenthalt wegen bevorstehenden chirurgischen Korrekturen) umfaßte 12 Kinder im Alter von 6 Monaten bis zu 6 Jahren.

Nach der Testung auf IgG-Antikörper konnten 9 Serumproben, die aufgebraucht waren, nicht mehr auf IgM-Antikörper getestet werden, so daß die Gesamtzahl der untersuchten Patienten bezüglich IgM von 93 auf 84 sank.

Anhand der im Labor eingegangenen bakteriologischen Befunde und der klinischen Angaben wurden die Patienten nach der Art der Infektion in mehrere Gruppen aufgeteilt. Die erste, vorläufige Aufteilung erfolgte vor der Versuchsdurchführung, um die Patienten nach verschiedenen Infektionen für die Versuchsreihen zu gruppieren.

Nach Abschluß der Antikörperbestimmungen wurden die Befunde überprüft und die Gruppenaufteilung überarbeitet. Dies betraf besonders die Gruppen I und II mit akuter Harnweg-

infektion bzw. Pyelonephritis, in denen einige Patienten neu zuzuordnen waren. Sehr hilfreich und notwendig für diese Korrekturen waren die durch das Studium der Krankenakten gewonnenen Informationen und Mitteilungen, für die ich Frau Birgit Ruhland danken möchte (141).

Schließlich ergab sich die folgende Gruppeneinteilung:

- I. : Kinder mit 10^5 gramnegativen Bakterien/ml Urin und der klinischen Diagnose akute (rekurrierende) Harnwegsinfektion (HWI) ohne morphologische Veränderungen der Niere.
- II. : Kinder mit rekurrerender Harnwegsinfektion und Pyelonephritis (PN) bei radiologisch erfaßten Nierenveränderungen, mit oder ohne akute Episode.
- III. : Kinder mit positiven Blutkulturen und der Diagnose gramnegative Sepsis.
- IV. : Kinder mit positiven Trachealabstrichen als Zeichen einer Kolonisation mit gramnegativen Bakterien (zum großen Teil bei intratrachealer Langzeit-Intubation).
- V. : Kinder mit gramnegativen Bakterien in Wundabstrichen nach Verbrennungen oder Operationen.
- VI. : Kinder ohne klinisch oder bakteriologisch festgestellte Infektion.

Wieviele Patienten jeder Gruppe zugeteilt waren und auf IgG- oder IgM-Antikörper gegen Lipoid A getestet wurden, ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3

Gruppe	Zahl der Patienten			
	IgG (davon älter als 3 Monate)		IgM (davon älter als 3 Monate)	
I. Harnwegsinfektion	17	(16)	16	(15)
II. Pyelonephritis	22	(21)	18	(17)
III. Sepsis	19	(10)	16	(8)
IV. Trachealkolonisation	17	(7)	16	(7)
V. Wundinfektion	6	(4)	6	(4)
VI. Kontrollgruppe	12	(12)	12	(12)
Summe:	93	(70)	84	(63)

5.2.1.2. Versuchsdurchführung und Bewertung in Phase I

Die Patientenserum wurden in je 6 Versuchsreihen auf IgG- und IgM-Antikörper gegen Lipoid A getestet. Wie im Abschnitt Methodik beschrieben (4.3.2.) wurden die 5 Serumverdünnungen von 1:10 bis 1:10⁵ mit 3 Parallelansätzen angelegt (Triplikat).

Zunächst betrachteten wir die graphischen Darstellungen der als Mittelwerte berechneten Extinktionen. Dabei fiel auf, daß deutliche Anstiege der Extinktionswerte sich fast immer nur bei 1:10 und 1:100 ablesen ließen. Bei niedrigerer Serumkonzentration, besonders 1:10⁴ und 1:10⁵, lagen die Extinktionen im Bereich der durch die Leerwerte gegebenen Grundlinie und waren nicht als Hinweis auf das Vorhandensein von Lipoid A-Antikörpern zu gebrauchen. Für

die Versuchsauswertung wurden daher nur die Zahlen der Verdünnung 1:10 und 1:100 verwendet.

In jedem Versuch testeten wir Referenzseren mit, die als "positiv" bzw. "negativ" gegen Lipoid A angesehen wurden.

Als positives Referenzserum zogen wir bei der IgG-Testung zum Beispiel aliquotiert eingefrorene Proben eines Erwachsenen heran, der an rezidivierenden Infektionen der Atemwege mit gramnegativen Bakterien litt und Lipoid A-Antikörper der Klasse IgG haben sollte. Als negatives Referenzserum für IgG dienten aus mehreren Einzelseren gesunder Erwachsener gemischte Proben, deren Extinktionen in Vorversuchen sehr niedrig waren.

Leider boten die Referenzseren von Versuch zu Versuch erhebliche Schwankungen in der Stärke der Reaktion. Diese waren bereits makroskopisch an der wechselnden Gelbfärbung der Substratreaktion zu erkennen. Ein rein numerischer Vergleich der Extinktionswerte aller Einzelversuche erschien danach nicht möglich. Um die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsreihen zusammenzufassen, verglichen wir deshalb für jeden Versuch getrennt die getesteten Seren bei der Verdünnung 1:10 mit den Referenzseren und teilten sie 3 Kategorien zu:

- + positiv
- +? fraglich positiv
- negativ

In jedem Versuch wurden anhand der graphischen Darstellungen der Extinktionswerte die Grenzen für die Zuteilung zu den 3 Gruppen bestimmt. Selbstverständlich lagen bei einem insgesamt in der Farbreaktion schwächer ausgefallenen Versuch die Grenzen niedriger als in einem Versuch, bei dem die Gelbfärbung im Vergleich der Referenzseren sehr intensiv war.

5.2.1.3. Statistische Auswertung von Phase I

Die Auswertung und Aufstellung der Versuchsergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biomathematik der Universität München. Herrn Thomas Zwingers bin ich für Planung und Beratung bei der Auswertung und den Einsatz der erforderlichen statistischen Programme zu Dank verpflichtet.

Die gemessenen Extinktionswerte der Parallelansätze wurden mit den wesentlichen Patientendaten in einen Computer eingegeben und die Mittelwerte errechnet. Aufgrund der für jeden Einzelversuch gezogenen Grenzen zwischen den Bewertungen positiv, fraglich positiv und negativ wurden die Ergebnisse der Serumtestungen nach diesen qualitativen Kategorien festgehalten.

5.2.1.4. Ergebnisse der Phase I

Da auch die Diagnosen der Patienten miteingespeichert worden waren, konnten die Ergebnisse für die einzelnen Krankheitsgruppen zusammengefaßt werden. Die Gruppen wurden im Hinblick auf den Anteil positiver und negativer Werte für Lipoid A-Antikörper in einer nicht-parametrischen Varianzanalyse miteinander verglichen. Wir führten die Rangsummenvergleiche mit und ohne Einbeziehung der Kontrollgruppe durch.

Sowohl bei der IgG- als auch bei der IgM-Testung ergab der Kruskal-Wallis-Test, daß sich die 6 Gruppen in ihren Rangsummen signifikant unterscheiden.

In den folgenden Tabellen sind die Bewertungen der Patientenuntersuchung gruppenweise aufgeführt.

Die Zeichen "+", "+-?" und "-" stehen für die Kategorien "positiv", "fraglich positiv" bzw. "negativ".

5.2.1.4.1. Tabellen für IgG

Tabelle 4 IgG-Bestimmung bei 93 Patienten

Gruppe	(n)	+	+ - ?	-
I. Harnwegsinfektion	(17)	7	2	8
II. Pyelonephritis	(22)	9	9	4
III. Sepsis	(19)	4	6	9
IV. Trachealkolonisation	(17)	3	5	9
V. Wundinfektion	(6)	4	1	1
VI. Kontrollgruppe	(12)	11	1	0
	(93)	38	24	31

In Tabelle 5 wurden die nur fraglich positiven und unsicheren Versuchsergebnisse eliminiert und die positiven bzw. negativen Resultate gegenübergestellt.

Tabelle 5 Vergleich der positiven oder negativen IgG-werte

Gruppe	(n)	+	-	(in %)	
				+	-
I. Harnwegsinfektion	(15)	7	8	46,7	53,3
II. Pyelonephritis	(13)	9	4	69,2	30,8
III. Sepsis	(13)	4	9	30,8	69,2
IV. Trachealkolonisation	(12)	3	9	25,0	75,0
V. Wundinfektion	(5)	4	1	80,0	20,0
VI. Kontrollgruppe	(11)	11	0	100,0	0,0
	(69)	38	31	55,1	44,9

Mit einer Kruskal-Wallis-Analyse zur Varianz der Testresultate wurden die Rangsummen der 5 bzw. 6 Diagnosegruppen (mit und ohne Kontrollgruppe) ermittelt und das Signifikanzniveau berechnet.

Tabelle 6 Rangsummenvergleich für IgG ohne Kontrollgruppe

Gruppe	(n)	Rangsumme
I. Harnwegsinfektion	(17)	690,0
II. Pyelonephritis	(22)	1063,0
III. Sepsis	(19)	674,0
IV. Trachealkolonisation	(17)	563,0
V. Wundinfektion	(6)	331,0

Ohne Einbeziehung der Kontrollgruppe ergibt sich im Rangsummenvergleich für IgG lediglich ein Signifikanzniveau von 0,0839. Werden die Rangsummen unter Berücksichtigung der aus 12 Seren gebildeten Kontrollgruppe neu berechnet, verbessert sich das Ergebnis deutlich. Im Rangsummenvergleich unterscheiden sich die 6 Gruppen signifikant bei einem Signifikanzniveau von 0,0007.

Zur besonderen Betrachtung der Lipoid A-Antikörper bei Neugeborenen zogen wir eine Altersgrenze bei 3 Monaten. Um mögliche Beeinflussungen durch mütterliche (IgG-)Antikörper, die via Plazentapassage ins Blut des Kindes gelangten und noch im Kreislauf zirkulierten, zu erfassen, teilten wir das Patientenkollektiv in Kinder, die jünger als 3 Monate zum Zeitpunkt der Serumentnahme waren, und die Hauptgruppe der über 3 Monate alten Kinder ein. Die getrennte Auflistung der Versuchsergebnisse bei Unterscheidung des Kindesalters zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7 IgG-Bestimmung unter Berücksichtigung des Kindesalters

Gruppe	Kinder älter als 3 Monate				Kinder jünger als 3 Monate			
	(n)	+	+-?	-	(n)	+	+-?	-
I. HWI	(16)	7	2	7	(1)	0	0	1
II. PN	(21)	8	9	4	(1)	1	0	0
III. Sepsis	(10)	1	3	6	(9)	3	3	3
IV. Tr.kol.	(7)	2	1	4	(10)	1	4	5
V. Wundinf.	(4)	3	0	1	(2)	1	1	0
VI. Kontr.gr.	(12)	11	1	0	(0)	0	0	0
	(70)	32	16	22	(23)	6	8	9

Eine weitere Tabelle stellt die Zusammensetzung der Patientengruppen im Verhältnis zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht dar.

Tabelle 8 Zahl der Jungen und Mädchen bei der IgG-Bestimmung

Gruppe	männl. weibl.		(n)	älter als 3 Monate		jünger als 3 Monate	
				männl.	weibl.	männl.	weibl.
I. HWI	6	11	(17)	6	10	0	1
II. PN	7	15	(22)	7	14	0	1
III. Sepsis	10	9	(19)	3	7	7	2
IV. Tr.kol.	10	7	(17)	4	3	6	4
V. Wundinf.	3	3	(6)	2	2	1	1
VI. Kontr.gr.	7	5	(12)	7	5	0	0
	43	50	(93)	29	41	14	9
in % :	46,2	53,8		41,4	58,6	60,9	39,1

Die nach männlichem und weiblichem Geschlecht getrennte Bewertung in den bekannten Diagnosegruppen ist der den IgG-Ergebnisteil abschließenden Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9 IgG-Bestimmung bei 43 Jungen und 50 Mädchen

Gruppe	männlich				weiblich			
	(n)	+	+-?	-	(n)	+	+-?	-
I. HWI	(6)	2	1	3	(11)	5	1	5
II. PN	(7)	3	3	1	(15)	6	6	3
III. Sepsis	(10)	1	3	6	(9)	3	3	3
IV. Tr.kol.	(10)	3	3	4	(7)	0	2	5
V. Wundinf.	(3)	3	0	0	(3)	1	1	1
VI. Kontr.gr.	(7)	7	0	0	(5)	4	1	0
	(43)	19	10	14	(50)	19	14	17

5.2.1.4.2. Tabellen für IgM

Dem Muster der auf den zurückliegenden Seiten beschriebenen Auswertungen der IgG-Bestimmungen entsprechend wurden auch für die IgM-Antikörper gegen Lipoid A Tabellen angefertigt.

Bei 9 von 93 Patienten waren die Serumproben nach der IgG-Testung verbraucht, so daß insgesamt nur 84 Seren verblieben.

Tabelle 10 IgM-Bestimmung bei 84 Patienten

Gruppe	(n)	+	+?	-
I. Harnwegsinfektion	(16)	7	6	3
II. Pyelonephritis	(18)	17	0	1
III. Sepsis	(16)	6	5	5
IV. Trachealkolonisation	(16)	2	2	12
V. Wundinfektion	(6)	2	1	3
VI. Kontrollgruppe	(12)	6	2	4
	(84)	40	16	28

Tabelle 11 Vergleich der positiven oder negativen IgM-Werte

Gruppe	(n)	+	-	in %	
				+	-
I. Harnwegsinfektion	(10)	7	3	70,0	30,0
II. Pyelonephritis	(18)	17	1	94,4	5,6
III. Sepsis	(11)	6	5	54,5	45,5
IV. Trachealkolonisation	(14)	2	12	14,3	85,7
V. Wundinfektion	(5)	2	3	40,0	60,0
VI. Kontrollgruppe	(10)	6	4	60,0	40,0
	(68)	40	28	58,8	41,2

Der Rangsummenvergleich mit dem Kruskal-Wallis-Test ergab folgende Unterscheidung der 5 Krankheitsgruppen:

Tabelle 12 Rangsummenvergleich für IgM ohne Kontrollgruppe

Gruppe	(n)	Rangsumme
I. Harnwegsinfektion	(16)	615,0
II. Pyelonephritis	(18)	956,0
III. Sepsis	(16)	553,0
IV. Trachealkolonisation	(16)	324,0
V. Wundinfektion	(6)	180,0

Nach dem Ergebnis dieser Varianzanalyse unterscheiden sich die 5 Gruppen signifikant bei einem ausgedruckten Wert für das Signifikanzniveau von 0,0000.

Unter Einbeziehung der Kontrollgruppe betrug das Signifikanzniveau für die Unterscheidung der 6 Diagnosegruppen 0,0001.

Wie bei der IgG-Auswertung wurden die Patienten nach dem Alter bei einer Grenze von 3 Monaten in 2 Gruppen aufgeteilt. So konnten die Bewertungen für Neugeborene mit einem noch als unreif anzunehmenden Immunsystem getrennt von der Mehrzahl der über 3 Monate alten Kinder herausgestellt werden.

Tabelle 13 IgM-Bestimmung unter Berücksichtigung
des Alters

Gruppe	Kinder älter als 3 Monate				Kinder jünger als 3 Monate			
	(n)	+	+-?	-	(n)	+	+-?	-
I. HWI	(15)	7	6	2	(1)	0	0	1
II. PN	(17)	16	0	1	(1)	1	0	0
III. Sepsis	(8)	3	4	1	(8)	3	1	4
IV. Tr.kol.	(7)	2	2	3	(9)	0	0	9
V. Wundinf.	(4)	2	1	1	(2)	0	0	2
VI. Kontr.gr.	(12)	6	2	4	(0)	0	0	0
	(63)	36	15	12	(21)	4	1	16

Von den 9 Patienten, deren Serumproben nicht mehr auf IgM-Antikörper gegen Lipoid A untersucht werden konnten, waren 7 männlich und 2 weiblich. Die dadurch bedingten Verschiebungen der Geschlechtsrelation im Vergleich zur Tabelle 8 sind in der nächsten Liste abzulesen.

Tabelle 14 Zahl der Jungen und Mädchen bei der IgM-Bestimmung

Gruppe	(n)		älter als 3 Monate		jünger als 3 Monate	
	männl.	weibl.	männl.	weibl.	männl.	weibl.
I. HWI	5	11	5	10	0	1
II. PN	3	15	3	14	0	1
III. Sepsis	8	8	2	6	6	2
IV. Tr.kol.	10	6	4	3	6	3
V. Wundinf.	3	3	2	2	1	1
VI. Kontr.gr.	7	5	7	5	0	0
	36	48	23	40	13	8
in % :	42,9	57,1	36,5	63,5	61,9	38,1

Die nach männlichem und weiblichem Geschlecht getrennte Bewertung der 6 Diagnosegruppen bildet den Inhalt der letzten Tabelle für die IgM-Ergebnisse in Phase I.

Tabelle 15 IgM-Bestimmung bei 36 Jungen und 48 Mädchen

Gruppe	männlich				weiblich			
	(n)	+	+-?	-	(n)	+	+-?	-
I. HWI	(5)	1	2	2	(11)	6	4	1
II. PN	(3)	3	0	0	(15)	14	0	1
III. Sepsis	(8)	3	2	3	(8)	3	3	2
IV. Tr.kol.	(10)	2	1	7	(6)	0	1	5
V. Wundinf.	(3)	1	0	2	(3)	1	1	1
VI. Kontr.gr.	(7)	3	1	3	(5)	3	1	1
	(36)	13	6	17	(48)	27	10	11

5.2.2. Verlaufsbeobachtung = Phase II

5.2.2.1. Patientengut der Verlaufsbeobachtung

Im 2. Abschnitt der experimentellen Untersuchungen mit ELISA wurden bei den Patienten, von denen mehrere Serumproben über den Zeitraum von wenigen Tagen bis zu Monaten gesammelt worden waren, Verlaufsbeobachtungen der Lipoid A-Antikörper durchgeführt. In Phase I, der Querschnittsuntersuchung, waren bei 81 bzw. 72 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen durch gramnegative Bakterien die Lipoid A-Antikörper der Immunglobulinklassen IgG und IgM bestimmt worden (Gruppen I - V). Bei 42 dieser Patienten lagen noch 2 oder mehr eingefrorene Serumproben mit verschiedenem Abnahmedatum vor, die in die Verlaufsbeobachtung aufgenommen werden konnten. Von 15 der verbleibenden 39 Patienten testeten wir bei den Versuchsreihen der Phase II eine Serumprobe mit, um deren Ergebnis dann mit dem der Phase I zu vergleichen. Bei wievielen Patienten der Krankheitsgruppen I - V genügend Serummaterial für die Verlaufsbeobachtung zur Verfügung stand, zeigt die nächste Tabelle.

Tabelle 16 Zahl der Verlaufsbeobachtungen in Phase II

Gruppe	Pat. im Verlauf getestet	(davon jünger als 3 Monate)	Gesamtzahl in Phase I
I. HWI	6	(1)	17
II. PN	7	(1)	22
III. Sepsis	12	(7)	19
IV. Tr.kol.	12	(7)	17
V. Wundinf.	5	(2)	6
	42	(18)	81

In der 2. Spalte wurden die Patienten aufgelistet, die bei der ersten Serumprobe im Rahmen der Verlaufstestung jünger als 3 Monate waren.

Der folgenden Tabelle ist zu entnehmen, wieviele Seren pro Patient getestet wurden.

Tabelle 17 Differenzierung der unterschiedlichen Serumzahlen für die 42 im Verlauf getesteten Patienten

Gruppe	Zahl der Seren pro Patient:						Gesamtzahl der	
	2	3	4	5	6	7	Pat.	Seren
I. HWI	4x	2x	-	-	-	-	6	(14)
II. PN	2x	1x	-	2x	2x	-	7	(29)
III. Sepsis	2x	3x	4x	2x	1x	-	12	(45)
IV. Tr.kol.	2x	1x	4x	4x	-	1x	12	(50)
V. Wundinf.	2x	1x	-	-	2x	-	5	(19)
	(12x)	(8x)	(8x)	(8x)	(5x)	(1x)	42	(157)

5.2.2.2. Versuchsdurchführung und Bewertung in Phase II

Bei der Untersuchung des Lipoid A-Antikörperverslaufs wurden die in Frage kommenden Seren für jeden Patienten ausgewählt und stets gemeinsam in einem Versuch mit ELISA getestet.

Wir führten insgesamt je 8 Versuchsreihen für IgG- und IgM-Antikörper durch, wobei eine Versuchsreihe zwischen 3 und 10 Verlaufsbeobachtungen, auch abhängig von der Serenzahl pro Patient, umfaßte. Nach den ersten Lipoid A-Antikörperbestimmungen mit ELISA hatte sich in unseren Versuchen gezeigt, daß deutliche Extinktionsanstiege erst bei den Serumverdünnungen 1:10 und 1:100 auftraten. Deshalb wurden - wie schon im Abschnitt Methodik (4.3.2.) beschrieben - in

der Phase II der Versuche nur noch die Verdünnungen 1:10 und 1:10² mit je 3 Parallelansätzen getestet. Durch den Verzicht auf weitere Serumverdünnungen bis 1:10⁵ konnten pro Versuch mehr Patientenseren einbezogen werden. Vor allem wurde aber der Verbrauch der wertvollen Antigenlösung eingeschränkt, da pro Serum nur noch 6 (2x3) statt 15 (5x3) Küvetten mit Lipoid A-Antigen beschichtet werden mußten. Wie bei der Versuchsauswertung in Phase I verglichen wir auch bei der Testung mehrerer Serumproben pro Patient die Extinktionswerte der Verdünnung 1:10 mit der Reaktion der als "positiv" bzw. "negativ" gegen Lipoid A eingestuften Referenzseren in jedem Versuch und nahmen eine qualitative Bewertung nach den Kategorien positiv ("+"), fraglich positiv ("+-?") und negativ ("-") vor.

Nachdem das in Phase I für IgG verwendete positive Referenzserum nicht mehr ausreichend hohe Extinktionswerte aufwies, wählten wir für die neuen Bestimmungen in Phase II Proben von mitgetesteten Patienten mit sehr hohen Extinktionen als positive Referenz. In einem Fall handelte es sich dabei um einen 2-jährigen Jungen mit akuter Harnwegsinfektion durch *Proteus mirabilis*; ein weiteres IgG-positives Referenzserum stammte von einem 1-jährigen Jungen mit Pyelonephritis, bei dem im Urin *E. coli* nachweisbar war. Als negative Referenzen für IgG dienten Proben eines 3-jährigen Mädchens mit akuter Harnwegsinfektion durch *E. coli*, das bei der Lipoid A-Antikörpertestung nur für IgM positive Resultate erzielte und für IgG als negativ einzustufende Extinktionen hatte, sowie eines 9-jährigen Jungen mit akuter Sepsis durch *Enterobacter agglomerans*. Die Extinktionswerte dieses Patienten lagen für IgG und IgM im negativen Bereich.

Für IgM wurden in Phase II der Experimente die gleichen Referenzseren eingesetzt, die bereits für die Querschnittsuntersuchung herangezogen worden waren.

Immer stark positiv mit IgM-Extinktionen über 2,0 und auffallend rasch zu beobachtender intensiver Gelbfärbung der Substratumsetzung reagierte das Serum eines 11-jährigen Mädchens mit chronischer Pyelonephritis und rekurrierenden fieberhaften Harnwegsinfektionen. Negatives Referenzserum für die IgM-Bestimmungen waren mehrere Serumproben eines erst 3 Monate alten Mädchens mit adrenogenitalem Syndrom. Der Urin dieses Kindes enthielt zwar wiederholt gramnegative Bakterien, doch konnten im Serum bei wahrscheinlich noch nicht suffizienter Antikörperbildung keine IgM-Antikörper nachgewiesen werden.

5.2.2.3. Auswertung von Phase II

Für die Verlaufsbeobachtung standen nur bei insgesamt 42 Patienten mehrere Serumproben zur Verfügung. Der Anteil von "follow-up"-Untersuchungen fiel für die einzelnen Krankheitsgruppen sehr unterschiedlich aus. So waren bei den Kindern mit Harnwegsinfektion und Pyelonephritis in wenigen Fällen noch 2 oder mehr Seren vorhanden (6 von 17 bei HWI, 7 von 22 bei PN). Dabei ist zu berücksichtigen, daß bei unkomplizierter Infektion des Harntraktes häufig nur eine Blutabnahme zur Feststellung entzündlicher Veränderungen veranlaßt wurde und sich einige Patienten lediglich ambulant in der Pyelonephritis-Sprechstunde vorstellten.

Bei den an Sepsis erkrankten Kindern konnten dagegen für 12 von 19 in die Querschnittsuntersuchung aufgenommenen Patienten die Antikörper gegen Lipoid A auch im Verlauf kontrolliert werden. 7 dieser 12 Patienten waren bei der ersten im Verlauf erfaßten Serumabnahme jünger als 3 Monate. Selbstverständlich wurden bei den an einer schweren und lebensbedrohlichen Infektion erkrankten Sepsis-Patienten regelmäßige Blutbildkontrollen vorgenom-

men, so daß mehr Material für die Lipoid A-Antikörper-testung vorlag als bei den Kindern mit Harnwegbefunden.

Auch bei 12 von 17 Kindern mit pathologischer Trachealkolonisation durch gramnegative Bakterien waren mehrere Serumproben vorhanden; das Alter betrug bei 7 der 12 Patienten weniger als 3 Monate.

Die Gruppe setzte sich überwiegend aus Kindern mit Langzeitintubation oder Tracheostoma zusammen, bei denen in Abständen Trachealsekret und Blutbild kontrolliert wurden.

Von der kleinsten Gruppe mit Wundinfektionen durch gramnegative Bakterien verfügten wir in 5 von 6 Fällen über weitere Serumproben.

Bei den Patienten der für die Querschnittsuntersuchung gebildeten Kontrollgruppe war stets nur ein Serum gesammelt worden, so daß keine Verlaufsbeobachtung der Lipoid A-Antikörper bei den Gesunden bzw. nicht bakteriell Erkrankten durchgeführt wurde.

Aufgrund der heterogenen Gruppenzusammensetzung mit sehr differierenden Patientenzahlen für die einzelnen Erkrankungen erscheint ein statistischer Vergleich der Gruppen für die Verlaufsbeobachtung nicht aussagekräftig. Nicht nur der Anteil der im Verlauf kontrollierten Kinder schwankte für jede Gruppe stark (siehe Tabelle 16), auch die wechselnde Serenzahl pro Patient zwischen 2 und 7 (siehe Tabelle 17) und die erheblichen Unterschiede in den Intervallen zwischen den Serumentnahmen, die sich zwischen Tagen und Wochen bis zu Monaten bewegten, schlossen eine mathematisch zusammenfassende Betrachtung der 42 Antikörperverläufe aus. Sinnvoll erscheint eine vergleichende Gegenüberstellung der Verläufe in jeder Krankheitsgruppe und die einzelne Diskussion interessanter Fälle. Die Extinktionswerte aller Bestimmungen in Phase II waren wieder zusammen mit den Patientendaten in einem Computer (Institut für Biomathematik, Universität München) gespeichert worden, so daß für jeden Patienten graphische Darstellungen der Extinktionswerte über den getesteten Zeitraum ausgedruckt werden konnten.

In diesem Sinne sollte die Auswertung der Verlaufs-
beobachtung als Kasuistik betrachtet werden.
Aufschlußreich ist der Vergleich von Ergebnissen der
Verlaufstestung bzw. wiederholenden Einzeltestung
mit den Resultaten der Querschnittsuntersuchung.

5.2.2.4. Ergebnisse der Phase II mit Interpretation

5.2.2.4.1. Harnwegsinfektion

Bei 6 Kindern mit akuter oder rekurrerender Harnwegsinfektion wurden nach der Querschnittsuntersuchung noch einmal 2 oder 3 Serumproben in einer weiteren Versuchsreihe getestet. Es folgen die Bewertungen der mit den Nummern H 1 - 6 bezeichneten Patienten:

Patient H 1,

männl., 2 Jahre alt, Spontanurin mit *Proteus mirabilis*

	(Einzelbewertungen)		(Gesamtbewertung)
IgG	+	+	+
IgM	+-?	+	(+)
Abstand der Serumproben in Tagen	0	8	

Tag des Urinbefunds: -2

Patient H 2,

weibl., 2 Monate alt bei Spontanurin mit Keimen der *Enterobacter*-Gruppe

IgG	-	+-?	Ø	+	- zu +
IgM	-	-	-	Ø	-
Serenabstand (d)	0	12	17	46	
Urinbefund (d)	: 2				(Ø = nicht getestet)

Patient H 3,

weibl., 2 Jahre alt, Katheterurin mit *E. coli*

IgG	+	(+)	+	+
IgM	+	(+)	+	+
Serenabstand (d)	0	(2)	5	
Urinbefund (d)	: -10			() = Testung in anderer Versuchsreihe!

Patient H 4,

weibl., 12 Jahre alt, Mittelstrahlurin mit *Pseudomonas aeruginosa*

IgG	-	+	- zu +
IgM	+	+	+
Serenabstand (d)	0	10	
Urinbefund (d)	: 2		

Patient H 5,

weibl., 3 Jahre alt, Katheterurin mit E. coli

	(Einzelbewertungen)	(Gesamtbewertung)
IgG	- -	-
IgM	+ +	+
Abstand der Serumproben in Tagen	0 2	
Tag des Urinbefunds: -6		

Patient H 6,

männl., 1,5 Jahre alt, Spontanurin mit Pseudomonas aeruginosa

IgG	+ + +-?	+
IgM	- +-? -	(-)
Serenabstand (d)	0 48 55	
Urinbefund (d) : -4		

Drei der in der Liste aufgeführten Patienten mit Harnwegsinfektionen hatten bei den Mehrfachbestimmungen schon zu Beginn positive IgG-Extinktionen (Nr. H 1, 3, 6); in zwei weiteren Fällen wechselte das IgG nach anfänglich negativen zu positiven Werten (Nr. H 2, 4). Nur bei einer Patientin (Nr. H 5) konnte kein positives IgG gegen Lipoid A gemessen werden. Allerdings lagen hier die beiden Serumproben mit 6 bzw. 8 Tagen nach dem bakteriologischen Befund im Urin so eng beieinander, daß von einer "Verlaufs"-testung nicht gesprochen werden sollte. Vielleicht wäre bei einer Tage oder Wochen später abgenommenen Serumprobe auch bei dieser Patientin ein positiver IgG-Wert für Lipoid A-Antikörper festgestellt worden.

Die für die Akutphase einer Infektion zu erwartenden IgM-Antikörper traten nur bei 4 der 6 Patienten auf (Nr. H 1, 3, 4, 5). Negativ blieben die Lipoid A-Antikörper der Klasse IgM bei der erst 2 Monate alten Patientin Nr. H 2 mit Enterobacter-Infektion, obwohl die IgG-Antikörper des mit adrenogenitalem Syndrom geborenen Kindes anstiegen. Das große Intervall von 48 Tagen zwischen erster und zweiter Serumbestimmung bei Patientin Nr. H 6 läßt die Vermutung zu, daß der mögliche IgM-Anstieg bei dieser Harnweg-

infektion verpaßt wurde und der fraglich positive Wert dem IgM-Abfall entspricht.

Der Vergleich der IgG- und IgM-Ergebnisse der 6 Verlaufstestungen mit den in Phase I von diesen Patienten untersuchten Proben ergab weitgehende Übereinstimmung. Lediglich bei Patient Nr. H 1 war in der Erstuntersuchung das IgG-Resultat negativ statt positiv ausgefallen.

Von Patientin Nr. H 3 waren mehrere kurz aufeinanderfolgende Serumproben in verschiedenen Versuchsreihen mitgetestet worden. Auffällig waren die konstant hoch liegenden, den Meßbereich des Photometers überschreitenden IgG-Extinktionen bei dem unter rezidivierenden Harnwegsinfektionen leidenden 2-jährigen Mädchen, das wegen adrenogenitalem Syndrom eine Vaginalplastik-Operation zu überstehen hatte. Auch die IgM-Werte lagen bei den verschiedenen Bestimmungen auf vergleichbarem hohen Niveau. Wahrscheinlich sind die hohen Lipoid A-Antikörper der Klasse IgG in diesem Fall durch die früheren bakteriellen Harnwegsinfektionen angeregt worden, während die hohen Lipoid A-IgM-Werte auf die akute Auseinandersetzung des Organismus mit Endotoxin bzw. Lipoid A hindeuten.

Die zeitlich verschobene Antikörperbildung im Rahmen einer Infektion zeigt die Befundkonstellation der 12-jährigen Patientin Nr. H 4. Bei Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* im Urin sind bereits IgM-Antikörper vorhanden. Dagegen kann der Anstieg der Lipoid A-Antikörper der IgG-Fraktion erst mit der zweiten Serumtestung etwa eine Woche später dokumentiert werden.

Ähnlich fielen die Ergebnisse bei einem 4-jährigen Mädchen mit Harnwegsinfektion (*Proteus mirabilis*) bei Nephrolithiasis und Pyelotomie aus, von dem nur noch ein einziges Serum für die wiederholende Bestimmung zur Verfügung stand. In der ersten Untersuchung eines am Tag nach dem Urinbefund gewonnenen Serums war Lipoid A-IgM stark positiv bei negativem IgG. Eine Woche später wurde

die zweite Serumprobe wieder für IgM positiv bewertet und der IgG-Wert nun als fraglich positiv eingestuft, was als Indiz für die verzögert ablaufende IgG-Antikörperbildung zu sehen ist.

5.2.2.4.2. Pyelonephritis

Zwischen 2 und 6 Serumproben untersuchten wir bei 7 Patienten mit Pyelonephritis und diagnostizierten morphologischen Nierenveränderungen. Die Ergebnisse sind anschließend dargestellt:

Patient P 1,

weibl., 10 Jahre alt, Urinbefunde mit Mischflora, Klebsiella oxytoca und E. coli

	(Einzelbewertungen)						(Gesamtbewertung)
	-	+-?	-	-	+	+-?	(+-?)
IgG	-	+	+	+	+	+	+
IgM	+	+	+	+	+	+	+
Abstand der Serumproben in Tagen	0	24	47	60	147	156	
Tage der Urinbefunde	:63, 102, 117						

Patient P 2,

weibl., 7 Jahre alt, Spontanurin mit E. coli

IgG	+	+	+	-(?)	+		+
IgM	+	+-?	+	-(?)	+		+
Serenabstand (d)	0	13	110	154	197		
Urinbefund (d)	:0						

Patient P 3,

männl., 1 Jahr alt, Urinbefunde mit E. coli und Pseudomonas aeruginosa

IgG	+	+	+	+	+		+
IgM	-	-	-	-	-		-
Serenabstand (d)	0	41	77	104	136		
Urinbefunde (d)	:-3, 44, 107						

Patient P 4,

weibl., 2 Monate alt bei Katheterurin mit Citrobacter freundii, weitere Urinbefunde mit Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella oxytoca und E. coli

IgG	+	+	+	+	+	-	+
IgM	-	-	-	+-?	-	-	-
Serenabstand (d)	0	8	38	78	141	150	
Urinbefunde (d)	:-16, 15, 33, 81, 128						

Patient P 5,

weibl., 11 Jahre alt, Urinbefunde mit *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* und *Proteus vulgaris*, zur Zeit der Serumentnahmen kein bakteriologischer Befund im Urin

	(Einzelbewertungen)	(Gesamtbewertung)
IgG	(+) + +	+
IgM	(+) + +	+
Serenabstand	(O) 23 Tage 12 Mon.	
Urinbefunde nach Monaten	:3, 4, 5	() = Testung in anderer Versuchsreihe!

Patient P 6,

weibl., 6 Jahre alt, kein bakteriologischer Befund bei nachgewiesener Pyelonephritis

IgG	+ +	+
IgM	+ +	+
Serenabstand(Mon.)	O 10 !	

Patient P 7,

weibl., 9 Monate alt bei Urinbefund mit *Pseudomonas aeruginosa*

IgG	(+) + + +	+
IgM	(+) + + +	+
Serenabstand (d)	(O) 17 22 27	
Urinbefund (d)	:-6	

Bei der Testung mehrerer Seren von Pyelonephritis-Kranken waren die IgG-Werte der Patienten Nr. P 2 - 7 positiv, nur bei Patientin Nr. P 1 ergaben sich schwankende, als fraglich positiv anzunehmende IgG-Resultate.

Interessant ist die Verteilung der IgM-Befunde mit in der Verlaufstestung über Monate konstant positiv bleibenden Werten für die Patienten Nr. P 1, 2, 5, 6. Von Patientin

Nr. P 7 fielen die nur über einen Monat gesammelten Seren ebenfalls IgM-positiv aus.

Die positiven Lipoid A-IgM-Antikörper scheinen nicht unmittelbar von einer akuten Harnwegsinfektion mit bakteriologischem Befund abhängig zu sein, da sie auch bei den Patientinnen Nr. P 5 und P 6, die sich bei bekannter Pyelonephritis zu ambulanten Kontrollen in der Klinik vorstellten, in Intervallen ohne Bakteriurie nachzuweisen waren.

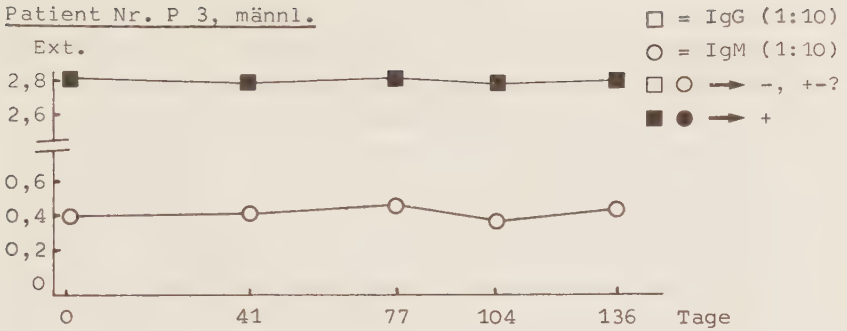
Als Hypothese wäre zu formulieren, daß bei chronischer Pyelonephritis eine permanente Stimulation zur Bildung und Aufrechterhaltung der Lipoid A-Antikörper vorliegen kann, auch wenn subjektive Beschwerden oder pathologische Urinbefunde fehlen.

Im Gegensatz dazu wurden für zwei Patienten (Nr. P 3 und P 4) mit schweren Nierenveränderungen und wiederholten signifikanten bakteriologischen Urinbefunden durch verschiedene gramnegative Keime keine positiven Lipoid A-Antikörper der IgM-Fraktion gefunden. Bei dem 1-jährigen Jungen führten die rekurrierenden Harnwegsinfektionen mit Hydronephrose und beidseitigem Ureterstoma zur Einordnung in die Pyelonephritis-Gruppe. Schon im Säuglingsalter von 2 Monaten entwickelten sich bei dem mit Doppelniere rechts geborenen Mädchen ständig wiederkehrende Harnwegsinfektionen und eine Hydronephrose; das Kind wurde bald nephrektomiert.

Es erstaunt, daß sich bei diesen noch sehr jungen Patienten keine IgM-Extinktionserhöhungen verfolgen lassen, während die IgG-Werte - als Zeichen bereits abgelaufener immunologischer Auseinandersetzungen mit Lipoid A (?) - von Beginn an erhöht sind.

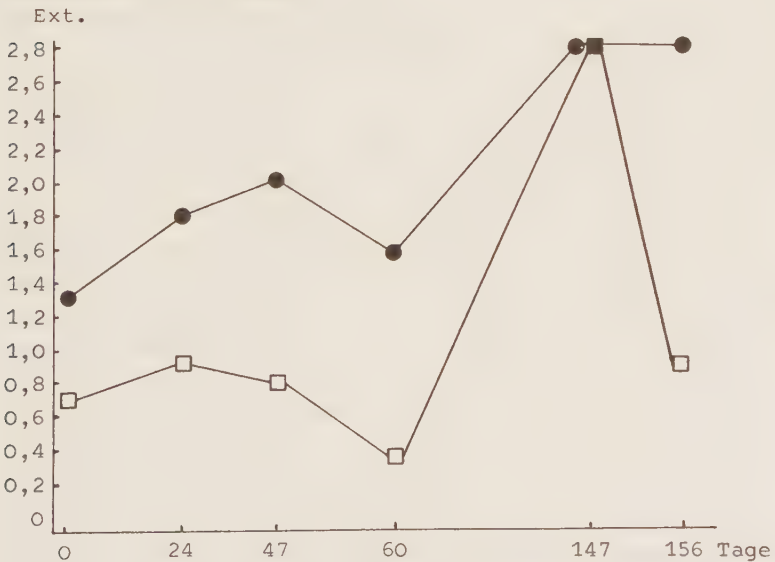
Die gleichförmigen Extinktionen des Jungen über mehrere Monate hinweg werden zur Verdeutlichung graphisch dargestellt:

Patient Nr. P 3, männl.



Variabler bei den Messungen über ein halbes Jahr verhielten sich die Extinktionen für Lipoid A-Antikörper bei der lebensbedrohlich erkrankten 10-jährigen Patientin mit dem Grundleiden Dermatomyositis und komplizierter Pyelonephritis.

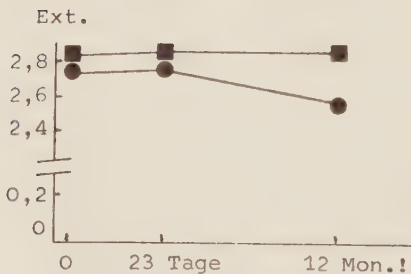
Patient Nr. P 1, weibl.



Neben wiederholten pathologischen Urinbefunden durch gramnegative Bakterien, aber auch Sproßpilze der Kandida-gruppe bei Hydronephrose und Pyelonephritis, traten bei diesem Kind zusätzlich ein Ileus und eine diffuse Perforations-Peritonitis auf, die von septischen Schüben begleitet wurden. Sicherlich war das Abwehrsystem der Patientin durch die komplexe (und einige Monate später zum Tode führende) Erkrankung mit ständigen Infektionen überfordert und in der Abwehrleistung beeinträchtigt. Zwar bildete der Organismus immer wieder Antikörper der Klasse IgM gegen Lipoid A, wie an den wechselnd hohen Extinktionen abzulesen ist, doch wurde kein dauernd positives Niveau an IgG-Antikörpern erreicht. Aus diesen Betrachtungen ist die Frage abzuleiten, ob das Fehlen des bei chronisch rezidivierenden Infektionen erwarteten IgG-Anstiegs als Hinweis auf eine (generalisierte) Abwehrschwäche interpretiert werden kann.

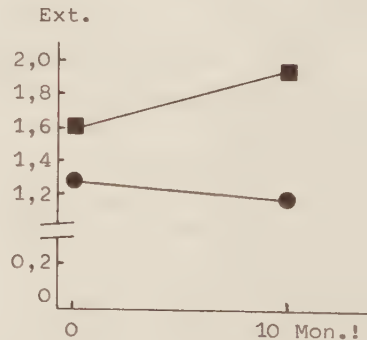
Gut vergleichbar erscheinen die Befundkonstellationen der bereits erwähnten Patientinnen Nr. P 5 und 6:

Patient Nr. P 5, weibl.



□ = IgG (1:10)
○ = IgM (1:10)

Patient Nr. P 6, weibl.



Die erste Serumprobe des 11-jährigen Mädchens (Nr. P 5) wurde abgenommen, als bei Fieber von 38,5°C der Verdacht auf eine erneute Episode rezidivierender Harnwegsinfektionen bestand. Die gleichzeitige Urinuntersuchung ergab keinen bakteriologischen Befund, doch wurden bei Kontrolluntersuchungen in den nächsten Monaten signifikante Keimzahlen mit verschiedenen gramnegativen Bakterien und Staphylococcus epidermidis gefunden. Die beiden anderen Serumproben knapp einen und 12 Monate später boten übereinstimmend mit der ersten Probe auffallend hohe Extinktionen im ELISA sowohl für IgG als auch für IgM; die makroskopisch zu beobachtende Farbreaktion bewirkte eine im Vergleich mit den Testansätzen anderer Patienten sehr intensive Gelbfärbung. (Zu erwähnen ist an dieser Stelle, daß eine Serumprobe des Mädchens wegen der eindeutig positiven IgM-Werte als Referenzserum in den Versuchsreihen der Phasen I und II eingesetzt worden war.)

Auch bei dem 6 Jahre alten Mädchen mit Nierenhypoplasie, vesicoureteralem Reflux und rekurrierenden Harnwegsinfektionen (Nr. P 6) lagen der IgG- und IgM-Wert der Lipoid A-Antikörper deutlich im positiven Bereich, wobei das Intervall der beiden Serumproben 10 Monate betrug. Die Urinuntersuchung blieb ohne pathologischen bakteriologischen Befund; zur Zeit der zweiten Serumabnahme erhielt das Mädchen als antibiotische Rezidivprophylaxe Cotrimoxazol. Gleichzeitig hohe IgG- und IgM-Werte konnten bei diesen beiden Mädchen in verschiedenen Serumproben unverändert gemessen werden. Die gleiche Korrelation wiesen einige Patienten mit Pyelonephritis auf, von denen über die Querschnittsuntersuchung hinaus keine weiteren Seren zur Verfügung standen.

Bemerkenswert ist dabei weniger der positive IgG-Befund nach beschriebenen bakteriellen Infektionen als die nahezu typisch wirkende IgM-Erhöhung auch ohne aktuellen Urinbefund, die zu der am Beginn dieser Besprechung von Pyelonephritisverläufen stehenden Hypothese über eine Dauersti-

mulation der IgM-Produktion führte. Als verantwortlich für den permanenten immunogenen Stimulus müßte die ständige Präsenz von Lipoid A als Antigen im Organismus der Pyelonephritiskranken angenommen werden!

Im Vergleich der 7 Verlaufsbeobachtungen mit den in Phase I, der Querschnittsuntersuchung, getesteten Seren der Patienten ergab sich für die Pyelonephritis-Gruppe wie für die Verläufe der "einfachen" Harnwegsinfektionen (siehe 5.2.2.4.1.) eine nahezu vollständige Übereinstimmung der Resultate bzw. der Extinktionsbewertungen.

5.2.2.4.3. Sepsis

Von 12 Patienten mit einer durch Blutkultur nachgewiesenen Sepsis wurden zwischen 2 und 6 Seren im Verlauf getestet. Die graphischen Darstellungen der Extinktionswerte zeigten meist nur geringe Schwankungen zwischen den Serumproben. In der folgenden Aufstellung sind die qualitativen Bewertungen für IgG und IgM zu sehen:

Patient S 1,

männl., 11 Jahre alt, Blutkultur (BK) mit E. coli

	(Einzelbewertungen)				(Gesamtbewertung)
IgG	-	-	-	-	-
IgM	-	+-?	-	-	-
Abstand der Serumproben (in Tagen)	0	4	18	31	
Tag der pos. BK	: 0				

Patient S 2,

weibl., 2,5 Monate alt bei BK mit Pseudomonas aeruginosa

IgG	+(?)	-	-	-	-	-
IgM	-	-	-	-	Ø	-
Serenabstand (d)	0	16	36	53	207	
pos. BK (d)	: 40					(Ø = nicht getestet)

Patient S 3,

männl., 1 Monat alt bei BK mit Pseudomonas aeruginosa

IgG	-	-	-			-
IgM	-	-	-			-
Serenabstand (d)	0	5	11			
pos. BK (d)	: 0					

Patient S 4,

weibl., 2 Wochen alt bei BK mit E. coli

IgG	-	-	+	+	+	- zu +
IgM	-	-	-	-	-	-
Serenabstand (d)	0 ^a	0 ^b	12	16	22	
pos. BK (d)	: 0					(Austauschtransfusion zwischen 0 ^a und 0 ^b !)

Patient S 10,

männl., 9 Jahre alt, BK mit Enterobacter agglomerans

	(Einzelbewertungen)	(Gesamtbewertung)
IgG	- +-?	-
IgM	- -	-
Abstand der Serumproben (in Tagen)	0 4	
Tag der pos. BK	:0	

Patient S 11,

männl., 1,5 Monate alt bei BK mit Serratia liquefaciens

IgG	+ +	+
IgM	- -	-
Serenabstand (d)	0 12	
pos. BK (d)	:-1	

Patient S 12,

weibl., 1 Jahr alt, BK mit E. coli

IgG	+ + +	+
IgM	- + +	- zu +
Serenabstand (d)	0 9 35	
pos. BK (d)	:1	

Bei den 12 Sepsiskranken lagen die IgG-Werte für Lipoid A-Antikörper sechsmal im negativ eingestuften Extinktionsbereich. In 5 Fällen waren die IgG-Werte durchgehend positiv; bei einer Patientin (Nr. S 4) wurden die IgG-Antikörper 2 Wochen nach positiver Blutkultur und Austauschtransfusion positiv.

Hervorzuheben ist die überraschende Tatsache, daß die IgG-Resultate bei der Verlaufstestung nicht nur qualitativ meist gleich beurteilt wurden, sondern auch mit den quantitativ erfaßten Extinktionswerten auf etwa einem Niveau blieben. Trotz nachgewiesener bakterieller Sepsis fanden wir bis auf Patientin Nr. S 4 keinen eindeutigen Anstieg der Lipoid A-Antikörper der Klasse IgG.

Vergleicht man die Beurteilungen der IgG-Verläufe mit den in Phase I, der Querschnittsuntersuchung, gewonnenen Werten von anderen Serumproben der betreffenden Patienten, ergeben sich nur in 2 von 12 Fällen widersprechende Resultate, bei denen statt "-" bei der Erstuntersuchung ein "+" (Nr. S 2) und umgekehrt statt "+" ein "-" (Nr. S 7) befundet worden war. Neben 5 eindeutigen Übereinstimmungen (Nr. S 1, 4, 5, 8, 10) lagen von den 5 übrigen Patienten, deren Seren bei der Vortestung im fraglich positiven Bereich eingeordnet waren, 4 in den Serumverläufen positiv (Nr. S 6, 9, 11, 12) und nur einer (Nr. S 3) negativ.

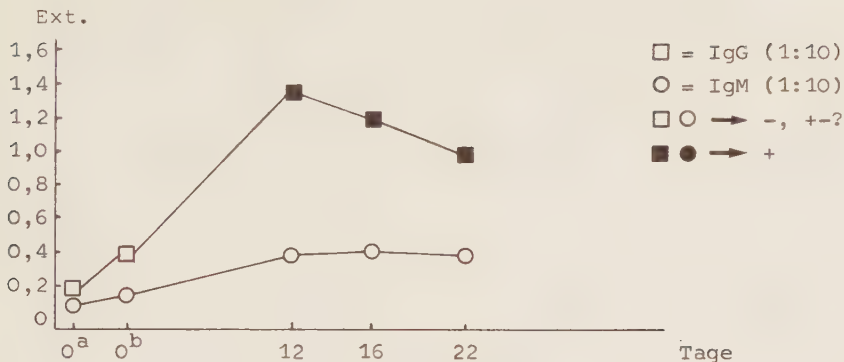
Für die IgM-Antikörper der Sepsiskranken stimmten die Beurteilungen von Phase I und II nur in 4 Fällen voll überein (Nr. S 5, 7, 11, 12).

Viermal waren in Phase I fraglich positive Beurteilungen bei Patienten abgegeben worden, die in der Verlaufstestung nur negative IgM-Werte hatten (Nr. S 2, 3, 6, 10). Auch bei 4 Patienten mit positivem IgM in der Ersttestung lagen die Verlaufswerte im negativen Bereich (Nr. S 1, 4, 8, 9)!

Insgesamt hatten 9 der 12 Sepsiskinder keine Anstiege der IgM-Werte. Bei Patientin Nr. S 7 stiegen die Extinktionswerte vom fraglich positiven, hingegen bei Patientin Nr. S 12 vom negativen in den positiven Bereich. Erst über 30 Tage nach positiver Blutkultur zeigte sich bei Patientin Nr. S 8 eine Entwicklung zu fraglich positiven IgM-Werten.

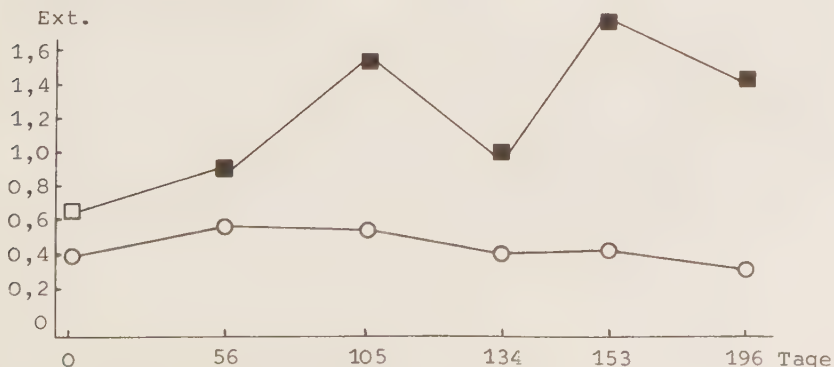
Für einige ausgewählte Patienten werden die genauen Extinktionswerte der IgG- und IgM-Verlaufstestung in den nächsten Abbildungen graphisch dargestellt.

Patient Nr. S 4, weibl.



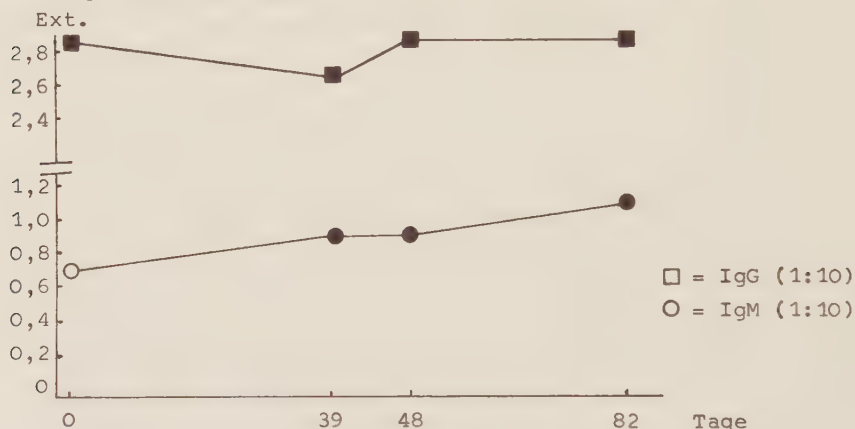
Bei dem erst 2 Wochen alten Mädchen wurde nach positiver Blutkultur mit E. coli (Tag 0) eine Austauschtransfusion durchgeführt. Die unmittelbar vor und nach der Transfusion gewonnenen Serumproben unterschieden sich nicht in den Lipoid A-Antikörpern. Auffällig ist, daß die IgM-Werte auch im weiteren Verlauf niedrig bleiben, während die IgG-Extinktionen bis in den positiven Bereich ansteigen. Dabei muß beachtet werden, daß die nächste Serumkontrolle nach ATT erst im Abstand von 12 Tagen (bei möglicherweise bereits wieder fallendem IgM) stattfand. Zu diskutieren ist die Übertragung von IgG-Antikörpern durch die Austauschkonserven als Ursache des Antikörperanstiegs.

Patient Nr. S 6, weibl.



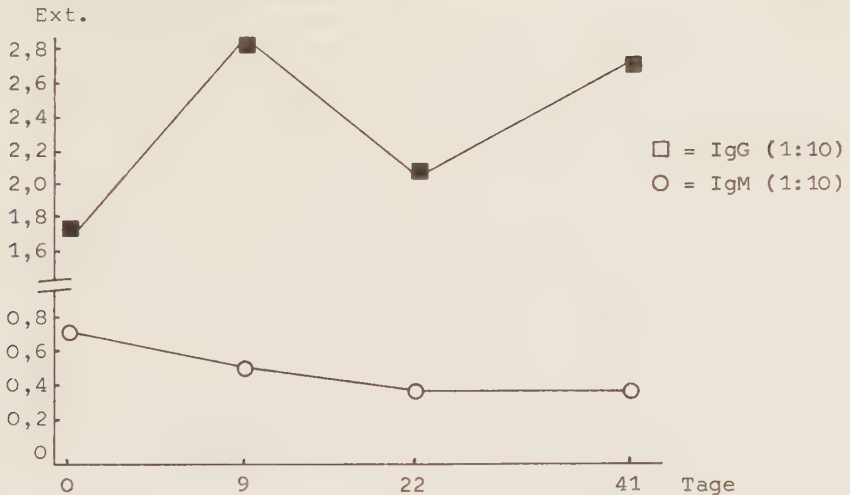
Dieses Mädchen erkrankte im Alter von knapp 3 Monaten an einer gramnegativen Sepsis durch *Serratia* oder *Enterobacter* (bakteriologischer Befund am Tag 0). Ein IgM-Anstieg war bei einem Probenintervall von 56 Tagen nicht zu erfassen. Nach niedrigem IgG in der Akutphase der Sepsis wurden bei den späteren Kontrollen positive IgG-Extinktionen festgestellt, die auch noch im Abstand eines halben Jahres persistierten.

Patient Nr. S 7, weibl.



Hier handelte es sich um ein 16-jähriges Mädchen mit Verdacht auf Kathetersepsis. Sowohl aus der Blutkultur wie von der Katheterspitze konnte um Tag 0 *Enterobacter cloacae* nachgewiesen werden. Zu erwähnen ist die klinische Angabe, daß sich trotz der bakteriologischen Befunde nicht das Bild einer schweren generalisierten Infektion bot. Die IgG-Werte liegen bereits bei der ersten Serumprobe sehr hoch; die Lipoid A-Antikörper müßten so schon bei einer früheren Infektion gebildet worden sein. Mit der Annahme einer frischen Infektion wäre der leichte IgM-Anstieg zu vereinbaren, doch verwundert, daß nach fast 3 Monaten noch immer ein positiver IgM-Wert vorliegt.

Patient Nr. S 9, männl.



Am 5. Tag nach der Geburt wurden bei dem männlichen Säugling gramnegative Bakterien (*E. coli*) in der Blutkultur gefunden. 7 Tage später erhielten wir das erste Serum zur Lipoid A-Antikörperbestimmung (Tag 0). Nach einer weiteren Woche waren neue Blutkulturen positiv für Keime der *Enterobacter-Serratia*-Gruppe (Tag 6), die anhaltende Sepsis wurde mit wiederholtem Wachstum von *E. coli* in der Blutkultur am Tag 25 bestätigt.

Die Lipoid A-IgG-Werte waren durchgehend positiv, dagegen stiegen die IgM-Werte trotz fortgesetzter Bakteriämie nicht an. Wahrscheinlich ist die diaplazentare Übertragung der IgG-Antikörper aus dem mütterlichen Blut der Grund für die hohen IgG-Extinktionen bei dem Neugeborenen, dessen eigene Antikörpersynthese noch nicht funktionsfähig zu sein scheint, da die Eigenproduktion der IgM-Antikörper gegen Lipoid A ausbleibt. Bekanntlich gibt es keine Plazentapassage für die im Vergleich zu IgG höhermolekularen IgM-Antikörper.

Die gleiche Konstellation mit hohem IgG und negativem IgM wies z.B. auch der Patient Nr. S 11 auf, der im Alter von 1,5 Monaten eine Sepsis (*Serratia liquefaciens*) erlitt. Die oben ausgeführte Hypothese des Nachweises mütterlicher IgG-Antikörper bei dem (noch) immundefizienten Säugling wird dadurch gestützt.

Von einigen Sepsispatienten wurde im Rahmen der Phase II nur ein einziges weiteres Serum im Vergleich zur Voruntersuchung (Phase I) getestet. So konnten auch bei einem am 8. Lebenstag an gramnegativer Sepsis erkrankten Mädchen wenige Tage und 2 Wochen später übereinstimmend positives IgG und negatives IgM gemessen werden.

Ein an akuter lymphatischer Leukämie leidendes Mädchen verstarb im 14. Lebensjahr nach einer Coli-Sepsis. Die Lipoid A-Bestimmungen bei 2 Serumproben zur Zeit der Infektion ergaben jeweils negative IgM-Werte und nur fraglich positive Extinktionen für IgG.

5.2.2.4.4. Trachealkolonisation

In der vierten Gruppe mit gramnegativen bakteriologischen Befunden wurden Seren von Kindern mit pathologischer Trachealbesiedelung gesammelt; die 12 Verlaufstestungen umfaßten zwischen 2 und 7 Seren. Die Ergebnisliste beginnt mit den jüngeren Patienten im Säuglingsalter:

Patient T 1,

männl., beim Neugeborenen Trachealabstriche mit gramnegativen Keimen, 1. Serumprobe vom 2. Lebenstag!

	(Einzelbewertungen)					(Gesamtbewertung)
IgG	-	-	∅	-	-	-
IgM	∅	∅	-	-	-	-
Abstand der Serumproben in Tagen	0	25	28	43	220	

(∅ = nicht getestet)

Patient T 2,

männl., 2 Monate alt, bei Trachealabstrich mit *Pseudomonas aeruginosa* (Trachealkanüle)

						(Wechsel zu + ?)
IgG	-	-	+ - ?	-	+	-
IgM	-	-	-	-	-	-
Serenabstand (d)	0	9	31	55	79	

Tag des Abstrichs: -1

Patient T 3,

weibl., 2 Monate alt bei Trachealabstrich mit *Pseudomonas aeruginosa* (Trachealkanüle)

IgG	-	-	∅	+ - ?	-	-
IgM	-	∅	-	-	-	-
Serenabstand (d)	0	27	33	36	75	

Abstrich (d) : 0

Patient T 4,

männl., 1 Monat alt, Trachealabstriche mit *Klebsiella oxytoca* und *Pseudomonas aeruginosa* (Frühgeburt)

IgG	-	-	-	-
IgM	-	-	-	-
Serenabstand (d)	0	4	41	

Abstriche (d) : 6, 13

Patient T 5,

weibl., 1,5 Monate alt, Trachealabstriche mit *Pseudomonas aeruginosa* (bronchopulmonale Dysplasie)

	(Einzelbewertungen)					(Gesamtbewertung)
	+	+	+--?	+--?	+--?	+ zu +--?
IgG						
IgM	-	-	-	-	-	-
Abstand der Serumproben in Tagen	0	11	22	26	53	

Patient T 6,

weibl., 8 Tage alt bei Trachealabstrich mit *Pseudomonas aeruginosa* (bronchopulmonale Dysplasie)

IgG	-	-	Ø	-	+--?	-
IgM	-	Ø	-	-	-	-
Serenabstand (d)	0	24	28	46	54	
Abstrich (d)	: -4					

Patient T 7,

männl., 3 Tage alt bei Trachealabstrich mit *E. coli*, Wochen später auch *Pseudomonas aeruginosa* (Frühgeburt)

IgG	+--?	+--?	-	+	-	(+--?)
IgM	-	-	-	-	-	-
Serenabstand (d)	0	2	18	30	66	
Abstriche (d)	: -25, -11, 5, 26					

Patient T 8,

weibl., 3 Monate alt bei Trachealabstrichen mit *Klebsiella pneumoniae*, später auch *Pseudomonas aeruginosa* (Trachealstenose und Ösophagusatresie)

IgG	+	+	+	+		+
IgM	+	-	+--?	+--?		(+--?)
Serenabstand (d)	0	25	43	97		
Abstriche (d)	: -9, 5, 14, 71, 85					

Unterschiedliche IgG-Werte gegen Lipoid A ergaben sich bei den Kindern mit Trachealkolonisation. Drei Patienten (Nr. T 8, 9, 10) hatten durchgehend positive Werte; in einem Fall sanken die Extinktionen vom positiven in den fraglich positiven Bereich ab (Patientin Nr. T 5). Während vier Patienten bei der IgG-Testung negativ blieben (Nr. T 1, 3, 4, 6, alle unter 3 Monate alt!) hatte ein kleiner Junge (Nr. T 2) in der letzten Serumbestimmung erstmals ein positives IgG-Resultat. Bei drei Patienten (Nr. T 7, 11, 12) traten schwankende IgG-Bewertungen von "-" bis "+" auf.

Klarere Ergebnisse brachte die IgM-Auswertung, wonach bei sämtlichen Kindern unter 3 Monaten nur negative Einstufungen vorlagen (Patienten Nr. T 1 - 7). In diesen Fällen bietet die Lipoid A-Antikörperbestimmung also trotz Trachealabstrichen mit gramnegativen Keimen keinen Hinweis für den Ablauf einer Infektion mit spezifischer Antikörperbildung. Da demnach keine Tracheal"infektionen" angenommen werden können, erfolgte die Zusammenstellung der Patienten dieser Gruppe auch unter der Bezeichnung "Trachealkolonisation"! Mehrere positive IgM-Bewertungen hatten die Patienten Nr. T 9, 10, 12 bei ebenfalls positiven IgG-Resultaten. In diesen Fällen scheint bakterielles Endotoxin die IgM-Antikörperbildung weiter zu stimulieren, obwohl IgG-Antikörper gegen Lipoid A vorhanden sind.

Auch bei der Patientin Nr. T 8 mit wiederholt pathologischer Trachealbesiedelung wurden nach dem IgM-Abfall später wieder fraglich positive Extinktionen gemessen bei auffällig hohen IgG-Werten.

Nicht interpretierbar sind die widersprechenden Resultate bei nur zwei Serumtestungen im Abstand von vier Tagen, die für einen 3 Jahre alten Jungen mit Langzeitbeatmung gefunden wurden. Sowohl für IgG als auch für IgM waren die Extinktionen bei der Wiederholungstestung negativ statt positiv, wobei sicher auch an einen technischen Fehler zu denken ist (Patient Nr. T 11).

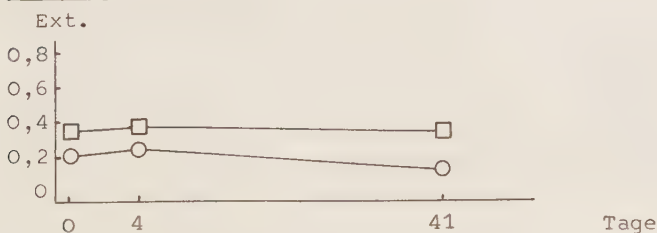
Die IgM-Antikörper betreffend entsprachen die Ergebnisse der Verlaufsbeobachtungen bei den Kindern mit Trachealkolonisationen den Bewertungen bei der Erstuntersuchung. Im Vergleich der IgG-Resultate der verschiedenen Versuchsreihen lagen jedoch einige differierende Resultate vor. Bei 4 der 12 Patienten mit positiven IgG-Werten in der Verlaufstestung waren in Phase I keine Antikörper gegen Lipoid A aus dieser Immunglobulinfraktion nachgewiesen worden (Patient Nr. T 5, 8, 9, 10). Einmal stand den konstant negativen IgG-Bewertungen der Verlaufstestung (bei dem Neugeborenen Nr. T 1) eine wohl anzuzweifelnde positive Bewertung bei nicht sehr hoher Extinktion gegenüber.

Auffallend unterschied sich der IgG-Verlauf der Patientin Nr. T 5 von dem der anderen Kinder im Säuglingsalter, für die exemplarisch die Extinktionskurve des Patienten Nr. T 4 ausgewählt wurde:

Patient Nr. T 5, weibl.



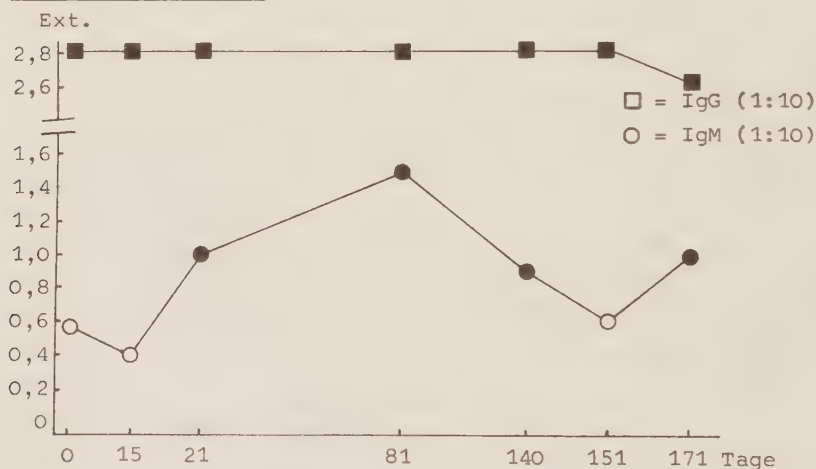
Patient Nr. T 4, männl.



Bei dem erst 1,5 Monate alten Mädchen mit bronchopulmonaler Dysplasie fielen die zunächst positiven Lipoid A-IgG-Antikörper zu fraglichen Werten ab (bei konstant negativem IgM), während bei dem männlichen Neugeborenen (1 Monat alt) keine Antikörper-Veränderungen als Zeichen einer Infektion zu beobachten waren. Auch für das Mädchen liegt die Vermutung nahe, daß die IgG-Werte nicht Ausdruck einer eigenen Immunantwort des Säuglings gegen Lipoid A sind, sondern auf die diaplazentare Übertragung mütterlicher Antikörper zurückgehen.

Als Beispiel für vorhandene IgM-Antikörper über einen längeren Zeitraum bei hoch positivem IgG gegen Lipoid A folgt die Abbildung der Extinktionen eines einjährigen Jungen mit Trachealkanüle:

Patient T 9, männl.



Wie zu Beginn dieser Ergebnisdiskussion ausgeführt, spricht die lange Persistenz von IgM-Antikörpern für eine dauernde oder wiederkehrende Immunantwort auf Lipoid A. Es wäre bei diesem Kind möglich, daß die rezidivierende Invasion gram-negativer Bakterien im Sinne einer Trachealinfektion die IgM-Antikörperbildung aufrecht erhält.

Patient W 4,

männl., 10 Tage alt bei Wundabstrich mit *Pseudomonas aeruginosa* (Ösophagusatresie)

	(Einzelbewertungen)						(Gesamtbewertung)
IgG	-	-	-	+-?	-	+	- zu + (?)
IgM	+	-	-	-	Ø	-	-
Abstand der Serumproben in Tagen	0	8	16	19	25	48	
Tag des Abstrichs :	0						(Ø = nicht getestet)

Patient W 5,

männl., 4 Monate alt bei Augenabstrich mit *E. coli*

IgG	+	+	Ø	+
IgM	Ø	-	-	-
Serenabstand (d)	0	2	4	
Abstrich (d)	: -3			

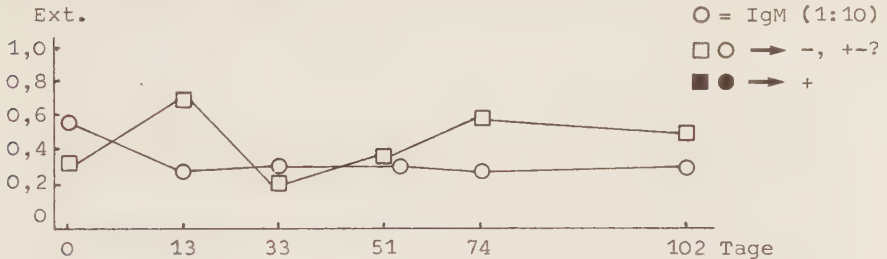
Nur relativ selten wurden in dieser aus 5 Patienten zusammengesetzten Gruppe Lipoid A-Antikörper nachgewiesen. Zwei Patienten hatten bereits positive IgG-Werte (Nr. W 3, 5). Dabei handelte es sich um ein 5-jähriges Mädchen mit großflächiger Verbrennung der Haut, bei dem im Wundabstrich *Pseudomonas aeruginosa* wuchs, und einen erst 4 Monate alten Jungen mit *E. coli* im Augenabstrich. Wahrscheinlich stammt bei dem Mädchen der gemessene IgG-Spiegel von einer früheren Infektion mit gramnegativen Bakterien. Der Wechsel des IgM-Wertes in den positiven Bereich am 20. Tag nach Ersttestung entspricht wohl einer neuen Stimulation zur Bildung von Lipoid A-Antikörpern durch die mit der Verbrennung verbundene *Pseudomonas*-Infektion. Dagegen erlauben die gemessenen Extinktionen bei dem Jungen mit bakteriell kontaminiertem Augenabstrich keine Aussage über eine Infektion, zumal weitere klinische Angaben fehlen.

Das Probenintervall ist mit 4 Tagen zu kurz, um einen eventuellen Anstieg der IgM-Werte zu erfassen. Außerdem sollte bedacht werden, daß die Lipoid A-Antikörper der IgG-Fraktion

bei diesem Kleinkind mit Zustand nach intrauteriner Asphyxie noch wegen diaplazentarer Übertragung von der Mutter positiv sein könnten.

Ein Anstieg der IgM-Werte blieb bei Patientin Nr. W 1 ebenso wie eine IgG-Veränderung aus. Offenbar führten die im Wundabstrich nachgewiesenen Bakterien nicht zur "Infektion" des einen Monat alten Mädchens, das wegen Gastroschisis auf der chirurgischen Intensivstation lag. Der flache Verlauf der Extinktionskurven über mehr als 3 Monate ist im folgenden Bild aufgezeichnet:

Patient Nr. W 1, weibl.



Am 10. Lebenstag enthielt das Wundsekret eines männlichen Neugeborenen mit Ösophagusatresie *Pseudomonas aeruginosa* (Nr. W 4). 7 Wochen später lag der IgG-Extinktionswert erstmals im positiven Bereich, doch konnte der für den Ablauf einer Immunisierung gegen Lipoid A erwartete IgG-Anstieg nicht entsprechend dokumentiert werden, da nur der erste (wohl zu frühe) IgM-Wert positiv war.

Leider wurden bei Patientin Nr. W 2, einem 2-jährigen Mädchen mit gramnegativen Bakterien im Wundabstrich der rechten Leiste, lediglich zwei Seren in direkter Folge am 3. und 4. Tag nach bakteriologischem Befund getestet, die beide schon IgM-, jedoch keine IgG-Antikörper besaßen. Weitere Serumproben zum Nachweis später gebildeter Lipoid A-Antikörper der IgG-Klasse lagen nicht vor.

Abschließend sei erwähnt, daß auch bei den Patienten mit bakteriell kontaminierten Wundabstrichen die Ergebnisse von Serumproben in den verschiedenen Versuchsreihen (Querschnitts- bzw. Verlaufsuntersuchungen) gut übereinstimmten.

5.2.3. Weitere Lipoid A-Bestimmungen

In diesem Abschnitt werden die Einzelbeobachtungen bei einigen Patienten mit verschiedenen Erkrankungen geschildert, die nicht den vorher beschriebenen Krankheitsgruppen zuzuordnen waren.

5.2.3.1. Meningitis

Von 2 Kindern mit Meningitis, in deren Liquor gramnegative Bakterien wuchsen, wurden Serumproben gesammelt und auf Lipoid A-Antikörper untersucht.

Ein neugeborenes Mädchen mit Spina bifida erkrankte schon in der dritten Lebenswoche an einer bakteriellen Meningitis mit gramnegativen Keimen der Citrobacter-Gruppe und Streptokokken (D) im Liquor. Bei insgesamt 4 Serumuntersuchungen in jeweils etwa wöchentlichem Abstand blieben die Extinktionen für IgG und IgM unverändert im negativen Bereich; somit waren keine Lipoid A-Antikörper nachzuweisen.

Bei einem 4 Monate alten Mädchen mit Wachstum von Pseudomonas aeruginosa im Liquor, für das später eine Salmonellen-Meningitis angegeben wurde, waren in Serumproben 2,7 und 16 Tage nach dem Pseudomonas-Befund die Werte für IgG-Antikörper gegen Lipoid A positiv, doch blieb auch hier ein IgM-Anstieg aus.

In beiden Fällen gelang trotz bakteriologischem Liquorbefund nicht der Nachweis einer reaktiven IgM-Antikörperbildung!

5.2.3.2. Morbus Crohn

Von einem 15-jährigen unter Morbus Crohn leidenden Mädchen wurden zwei Serumproben getestet. Bei bakteriologischer Untersuchung fanden sich in der Stuhlflora der mit Antibiotika behandelten Patientin wiederholt *Pseudomonas aeruginosa* und auch Streptokokken; die damit verbundenen Lipoid A-Antikörperbestimmungen der im Abstand von 10 Tagen gewonnenen Seren ergaben positive IgM- und nur fraglich positive IgG-Werte. Auffallend war der sehr geringe Unterschied der Extinktionen für die zwei Serumtestungen.

Eine weitere 12-jährige Patientin mit Morbus Crohn war in der Auswertung wegen einer akuten Harnwegsinfektion (*Pseudomonas aeruginosa*) der Patientengruppe I (HWI) zugeteilt worden (siehe Nr. H 4 unter 5.2.2.4.1.).

Bei diesem Mädchen waren ebenfalls positive IgM-Werte und ein IgG-Anstieg gemessen worden, die mit der Harnwegsinfektion zu erklären sind.

Trotzdem wäre zu diskutieren, ob bei Patienten mit Morbus Crohn die IgM-Antikörper gegen Lipoid A typischerweise erhöht sind, wofür die Ergebnisse der beiden obigen Patienten sprechen könnten. Zur Beantwortung der Frage, wie häufig Lipoid A-Antikörper der IgM- oder IgG-Fraktion beim Morbus Crohn auftreten, müßten gezielt Serumproben von Patienten mit dieser entzündlichen Darmerkrankung für eine ELISA-Testung gesammelt werden.

5.2.3.3. Mukoviszidose

Zwei 8 und 11 Jahre alte Jungen mit Mukoviszidose hatten deutlich positive IgG-Werte für Lipoid A-Antikörper; IgM-Antikörper ließen sich nur bei dem älteren Patienten nachweisen.

Es ist anzunehmen, daß an diesem autosomal-rezessiven Erb-leiden erkrankte Kinder durch die typischen Infektionen der Lunge (z.B. mit *Pseudomonas aeruginosa*) frühzeitig Antikörper gegen Lipoid A entwickeln.

6. Diskussion

6.1. Anwendung und Auswertung des ELISA

Der ELISA wurde im Abschnitt 1.3. der Einführung und dem Teil 4. der Arbeit zur Methodik der experimentellen Bestimmungen beschrieben und als hochsensitive und spezifische Labormethode zum Nachweis von Antikörpern herausgestellt (25). Für unsere Versuche wählten wir in der Kinderklinik ein automatisiertes ELISA-System der Firma Gilford mit kleinen Küvetten; alternativ existieren die von vielen Arbeitsgruppen verwendeten Verfahren mit Mikrotiterplatten. Die Inkubationszeiten für die verschiedenen Arbeitsschritte des sandwich-Verfahrens waren den ersten zur Verfügung stehenden Anleitungen folgend (18, 24) sehr lang, so daß sich die Versuche stets über 2 Tage erstreckten. Ziel neuer Untersuchungen sollte es sein, die Inkubationszeiten für die einzelnen Schritte versuchsweise zu verkürzen, um die Praktikabilität der ELISA-Antikörperbestimmung an einem Tag zu gewährleisten.

Wichtig für die Spezifität der Antikörperbestimmungen war die Verwendung einer reinen Lipoid A-Präparation, wie wir sie von C. Galanos in alkalibehandelter Form erhielten. Da wir die unverdünnten Antigenmengen von je 1 ml mit 2 mg Lipoid A-OH nach dem Verbrauch bei den Versuchsreihen bestellten, wurden die Gläschen immer in einer relativ kurzen Zeit von einigen Wochen verbraucht und damit die Möglichkeit der Versuchsverfälschung durch unterschiedlich lange Lagerzeiten des Antigens weitgehend eingeschränkt. Selbstverständlich bemühten wir uns bei allen Laborvorgängen, sterile Kautelen einzuhalten und bakterielle Kontaminationen der im ELISA eingesetzten Reagenzien zu vermeiden. Dies war für die aus destilliertem Wasser hergestellten PBS-Tween-Spüllösungen von Bedeutung, aber natürlich auch für die eingefrorenen Serumproben, die Enzymkonjugatlösungen und die jeweils neu aufzulösenden Substratmengen. Be-

züglich der auf ihren Antikörpergehalt getesteten Patientenseren ist zu vermerken, daß die Proben in kleinen "Plastikhütchen" bei -20°C eingefroren wurden. Das Auftauen der Serumproben für die IgG-Bestimmung, später für die IgM-Bestimmung erfolgte nach Auswahl der zu testenden Patientenseren immer erst kurz vor dem Anlegen der Verdünnungsreihen. Die Patientenseren waren über den Zeitraum von etwa einem Jahr gesammelt worden; die anschließenden ELISA-Testungen erstreckten sich über mehrere Monate. Nach Angaben in der Literatur sollte die Antikörperaktivität durch differierende Aufbewahrungszeiten über ein Jahr hinaus bis zu mehreren Jahren nicht entscheidend beeinflusst werden, wenn die Seren bei ausreichend niedriger Temperatur im Gefrierschrank aufgehoben sind (1). Auch wenn in einer neueren Arbeit über einen Abfall der Spezifität des ELISA bei langjähriger Serumaufbewahrung berichtet wird, der auf die unspezifischen Hintergrundaktivitäten der menschlichen Seren zurückzuführen sei (110), ist eine wesentliche Auswirkung dieses Störeinflusses bei unseren Versuchen nicht anzunehmen, da die Extinktionshöhen bei der Wiederholungstestung einzelner Seren zumindest in einem ähnlichen Bereich lagen.

Zur Suppression der unspezifischen Hintergrundaktivitäten beim ELISA werden sowohl BSA (bovine serum albumin) als auch Tween 20 eingesetzt. Obwohl der Nutzen einer Kombination von BSA und Tween 20 als blockierenden und den ELISA schützenden Substanzen nicht eindeutig nachgewiesen ist (17), behielten wir nach den Ergebnissen der Vorversuche (5.1.2.) die Nachbeschichtung mit BSA vor dem Zusatz der Antisera neben den üblichen Spülungen mit PBS-Tween-Waschlösung bei. Zur Frage der Spezifität des ELISA ist zu ergänzen, daß eine häufige Kontamination handelsüblicher Enzymkonjugate mit Endotoxin festgestellt werden konnte (16). Die Ergebnisverfälschung durch Interaktionen des kontami-

nierenden Endotoxins mit an die feste Phase der Küvetten gebundenen Antikörpern betrifft dabei aber hauptsächlich Assays, mit denen ein Antigennachweis geführt werden soll.

Im Abschnitt 5. über die Versuchsreihen zur Lipoid A-Antikörperbestimmung wurde erläutert, daß die Extinktionen der untersuchten Seren bei manchen Versuchsreihen erhebliche Schwankungen zeigten, wie an der wechselnden Stärke der Farbreaktionen bei den mitgetesteten Referenzseren abzulesen war. Für die Auswertung des ELISA, dessen Empfindlichkeit gegen äußere Einflüsse, wie z.B. Temperaturwechsel im Labor, hervorgehoben werden muß, schied somit eine quantitative Betrachtung der gemessenen Extinktionen zum Vergleich aller erfaßten Patientenseren aus. In den Versuchsreihen der Phase I (Querschnittsuntersuchung) waren die Seren in jeweils 5 Verdünnungsstufen getestet worden, wobei deutliche Anstiege der Extinktionswerte etwa ab $1:10^3$ zu beobachten waren. Aufgrund der beschriebenen Schwankungen in der Stärke der Farbreaktionen erschien es allerdings auch nicht möglich, die Seren nach der Lage des 1. Extinktionswertes bei einer bestimmten Serumverdünnung über einem festgesetzten Extinktionsniveau mit einer üblichen Titerangabe zu bewerten. Es ist einsichtig, daß bei Versuchen mit insgesamt schwacher Farbreaktion (abzulesen an den Referenzseren!) viele Seren mit einer zu niedrigen Titerstufe versehen worden wären, während andererseits bei einigen Versuchen mit heftigen Farbreaktionen Seren einen falsch hohen Antikörpertiter erhalten hätten. Voraussetzung für eine Bewertung des Antikörpertiters nach dem Logarithmus der Serumverdünnung, bei dem ein definierter Extinktionswert überschritten wird (80, 81), wäre eine weitgehendere Übereinstimmung der Farbreaktionen von Versuch zu Versuch gewesen. Wir mußten daher bei unserer Auswertung einen anderen Modus wählen. Es wurden nur die Extinktionen der Serum-

verdünnung 1:10 betrachtet und nach den Ergebnissen der Referenzseren für jede Versuchsreihe Extinktionsgrenzwerte zwischen den Kategorien positiv, fraglich positiv und negativ festgelegt. Anschließend wurden dann die getesteten Patientenseren diesen 3 Rubriken zugeordnet. Somit war es möglich, nach einer qualitativen Einteilung der Versuchsergebnisse die Einzelbewertungen für die Patienten aus verschiedenen Krankheitsgruppen zusammenzufassen und mit statistischen Methoden in der Querschnittsuntersuchung (Phase I) zu vergleichen.

In der Phase II, der Verlaufsbeobachtung von Lipoid A-Antikörpern bei Patienten mit mehreren Serumproben, wurde die Bewertung der gemessenen Extinktionen nach dem gleichen Prinzip vorgenommen. In den für jede Krankheitsgruppe getrennt zusammengestellten Verlaufsbeobachtungen sind deutliche Extinktionsveränderungen als Wechsel in den Bewertungen +/+?-?/- erfaßt. Für interessante Kasuistiken wurde der Verlauf der Extinktionswerte graphisch dargestellt; in diesen Fällen ist der quantitative Vergleich der Extinktionshöhen bei verschiedenen Serumproben eines Patienten gestattet, da die Testung der ausgewählten Seren jeweils in einer Versuchsreihe stattfand.

6.2. Vergleich der Lipoid A-Antikörper bei Infektionen

Die Versuchsergebnisse der Lipoid A-Antikörperbestimmungen mit ELISA wurden bei der Querschnittsuntersuchung für verschiedene Diagnosegruppen zusammengefaßt. Die Einteilung der Kinder in die Gruppen erfolgte nach den bakteriologischen Befunden und den klinischen Angaben über Art der Infektion und ihren Verlauf.

Harnwegsinfektionen sind als Besiedelung und Infektion des Harntraktes mit Mikroorganismen definiert, wobei sowohl die infrapelvinen als auch die suprapelvinen Harnwege be-

troffen sein können (123, 130). Eine Keimzahl von mehr als 10^5 Bakterien/ml Urin wird als signifikante Bakteriurie betrachtet.

Schwierig ist die Differenzierung der Pyelonephritis als eigenständiges und speziell das Nierengewebe erfassendes Krankheitsbild von dem Oberbegriff der Harnwegsinfektion (HWI). Bei der Untersuchung von Parametern, die auf eine Nierenfunktionsstörung hindeuten, fanden U. Wichmann und W. Marget, daß in einem hohen Prozentsatz der HWI die Konzentrationsfähigkeit der Nieren eingeschränkt und damit die Urinosmolalität erniedrigt ist (130). Deshalb muß sicherlich bei vielen Harnwegsinfektionen mit einer entzündlichen Beteiligung der Niere gerechnet werden.

In der vorliegenden Studie unterteilten wir die Patienten mit gramnegativen bakteriologischen Urinbefunden danach, ob Anhaltspunkte für eine bleibende pathologische Veränderung der Niere als Äquivalent einer chronischen Pyelonephritis vorlagen. Die Lipoid A-Antikörperresultate der Gruppe I mit HWI ohne morphologische Nierenalterationen sind der Gruppe II mit Pyelonephritis gegenübergestellt worden. In dieser PN-Gruppe waren Kinder mit radiologisch beschriebenen Nierenveränderungen oder häufig rekurren-der Bakteriurie.

Die Ergebnisse der ELISA-Bestimmungen der Lipoid A-Antikörper wurden tabellarisch im Abschnitt 5.2.1. dieser Arbeit aufgeführt. Die Gruppe I umfaßte für IgG-Antikörper 17 Patienten, die Gruppe II 22 Patienten. Für die IgM-Bestimmungen standen Seren von 16 Patienten der Gruppe I und 18 Patienten der Gruppe II zur Verfügung. Auffällig war der Vergleich der IgM-Ergebnisse: bei 17 der 18 Patienten mit Pyelonephritis wurden positive IgM-Werte für Lipoid A-Antikörper gemessen, während nur 7 von 16 Kranken mit HWI positive IgM-Antikörper aufwiesen. In 6 Fällen lauteten die Einstufungen bei HWI fraglich positiv und in 3 Fällen negativ; dagegen hatte nur 1 PN-Patient ein negatives IgM-Resultat (siehe Tabelle 10)!

Positive Antikörper der Immunglobulinklasse IgM können als Hinweis auf die aktive Auseinandersetzung des Organismus mit dem Antigen Lipoid A gesehen werden. Die positiven IgM-Werte für Lipoid A-Antikörper bei den Kindern mit Pyelonephritis (Gruppe II) unterstützen die Hypothese, daß Lipoid A eine Bedeutung in der Pathogenese der chronischen Pyelonephritis hat. M. Westenfelder wies Immunkomplexe aus Lipoid A-Antigen und spezifischen Lipoid A-Antikörpern bei experimentell induzierten interstitiellen Nephritiden nach und stellte somit eine Beziehung zwischen der Produktion von Lipoid A-Antikörpern und einer entzündlichen Nierenschädigung her (120, 122, 123, 124). Wegen der Annahme eines schädlichen Einflusses der Lipoid A-Antikörper auf das Nierengewebe erscheint es sinnvoll, bei Patienten mit Harnwegsinfektionen durch gramnegative Bakterien nach Lipoid A-Antikörpern der Klasse IgM zu suchen, wie es mit dem ELISA möglich ist.

Da in 17 von 18 Fällen positive IgM-Werte bei den Kindern mit Pyelonephritis gemessen wurden, liegt die Vermutung nahe, daß die Lipoid A-Antikörper im Serum bei Harnwegsinfektionen mit den entzündlichen Veränderungen im Nierenparenchym korrelieren, in die die erwähnten Immunkomplexe involviert sind. Bei Kindern mit erhöhten Lipoid A-Antikörpern (IgM) sollte also der möglichen Nierenbeteiligung im Rahmen der Harnwegsinfektion besondere Beachtung geschenkt werden! Nur 7 der 16 Patienten mit HWI ohne nachgewiesene Nierenveränderungen (Gruppe I) hatten positive IgM-Werte, es wäre gerade bei diesen Kindern interessant zu klären, ob nicht doch Hinweise auf eine chronische Pyelonephritis bestehen.

Als Schlußfolgerung unserer IgM-Bestimmungen bei Kindern mit akuter oder chronisch rekurrierender HWI wäre zu formulieren, daß bei positiven Antikörpern gegen Lipoid A Veränderungen im Nierenbecken zu erwarten sind.

Vergleicht man die IgG-Resultate für Lipoid A-Antikörper bei den Gruppen HWI und PN, sind keine eindeutigen Unterschiede in der Häufigkeit positiver und negativer Werte zu erkennen (siehe Tabelle 4). Den 7 positiven IgG-Bewertungen bei HWI stehen 8 negative gegenüber; bei PN beträgt das Verhältnis 9 zu 4, doch ist hier der Anteil der fraglich positiven Beurteilungen mit 9 statt 2 deutlich höher. Werden IgG-Antikörper als Zeichen einer abgelaufenen Infektion mit gramnegativen Bakterien angenommen, überraschen die negativen Befunde besonders bei den PN-Patienten, denn bei den wiederholten Auseinandersetzungen des Organismus mit dem toxischen Antigen der Lipopolysaccharide sollten eigentlich persistierende Lipoid A-Antikörper auch der Klasse IgG nachzuweisen sein. Für die Betrachtung der Infektionen des Harntraktes scheinen die IgM-Antikörper aussagekräftiger zu sein als IgG, doch ist zu berücksichtigen, daß vorläufig nur kleine Patientenkollektive untersucht wurden und die Bedeutung des IgG weiter beleuchtet werden muß. Allerdings wird bereits in früheren Publikationen über die spezifische IgM-Antwort beim Bakterienbefall der Harnwege berichtet, auf die Marget in Betrachtungen zur Pathogenese der nichtobstruktiven chronischen Harnweginfektionen verwies (73). Folgt man der Hypothese eines möglichen Autoimmunmechanismus und der Beteiligung von Lipoid A bei der Ätiologie der Harnweginfektionen, die sich aus Tierexperimenten ergibt, in denen immunologisch noch unreife Welpen trotz Lipoid A-Injektion keine pathologische Reaktion entwickelten (74, siehe auch Abschnitt 3. dieser Arbeit), sind bei der Pyelonephritis unter konstantem Antigenstimulus Immunkomplexe mit IgM-Antikörpern gegen Lipoid A als schädigende Komponente zu fordern.

Aus ihren Bestimmungen von Lipoid A-Antikörpern mit ELISA schloß eine schwedische Gruppe um I. Mattsby-Baltzer ebenfalls, daß hohe Antikörpertiter gegen Lipoid A Indikator einer schweren renalen Entzündung mit konsekutiver Vernarbung sein können, doch wurden bei dieser Studie im Gegensatz zu unserem Ergebnis hauptsächlich Erhöhungen des IgG-

Anteils festgestellt (81).

In einer Arbeit über die Entstehung von Nierenvernarbungen nach Pyelonephritis kamen H. Huland et al. zu dem Ergebnis, daß eine Harnwegsinfektion unabhängig vom symptomatischen oder asymptomatischen Verlauf allein ohne komplizierende urologische Faktoren wie z.B. Reflux oder Obstruktion nicht zur radiologisch signifikanten Nierenschädigung führte (53). Natürlich spielen bei der Pathogenese der chronischen Pyelonephritis neben den vermuteten immunologischen Mechanismen die lokalen Verhältnisse der ableitenden Harnwege eine wesentliche Rolle.

Zum Abschluß der Diskussion über die Lipoid A-Antikörper bei Harnwegsinfektion und Pyelonephritis ist zu sagen, daß die vorliegenden ELISA-Ergebnisse die früheren Resultate der Bestimmung mit dem passiven Hämolysetest bestätigen, der aber noch keine Differenzierung von IgG und IgM erlaubte. Diese Studien ermittelten signifikant höhere Lipoid A-Antikörper bei Kindern und Erwachsenen mit chronischer Pyelonephritis oder rezidivierenden Harnwegsinfektionen im Vergleich zum akuten, unkomplizierten Infekt der Harnwege (112, 121).

In Fällen mit Lipoid A-Persistenz im Nierengewebe und daraus hypothetisch abgeleiteter fortschreitender Gewebeschädigung sollte eine antibiotische Langzeitprophylaxe durchgeführt werden, um Reinfektionen zu vermeiden und so die Abräumung von Lipoid A aus der Niere zu fördern (121).

Zu bedenken ist aber die schlechte Compliance hinsichtlich der Medikamenteneinnahme; bei der Kontrolle einer Langzeittherapie von Kindern mit rekurrrierender HWI fanden F. Daschner und W. Marget heraus, daß nur 32 % der jungen Patienten die Tabletten regelmäßig einnahmen (22). Um rechtzeitig auch asymptomatische Bakteriurien zu erfassen, die eine Nierenschädigung nach sich ziehen können und einer eventuellen Behandlung bedürfen, ist bei kleinen Kindern die genaue Erhebung der Vorgeschichte neben dem

bakteriologischen Screening wichtig (99). Als Dispositionsfaktor für rekurrende HWI belegten K. Hofmann et al. eine zumindest passager veränderte bakterielle Periurethralflora bei jungen Mädchen; die häufigere Kolonisierung mit Enterokokken neben gramnegativen Bakterien ist bei den disponierten Kindern wahrscheinlich auf eine lokale Abwehrschwäche der Urethralschleimhaut zurückzuführen (51). Zur Prophylaxe und frühzeitigen Therapie beginnender Nierenschädigungen durch Pyelonephritis bei Patienten mit (gramnegativen) bakteriellen Infektionen der Harnwege wäre es unbedingt wünschenswert, einen sensitiven Serumparameter für die Nierenparenchymbeteiligung in der Laborroutine einzuführen. Nach unseren Untersuchungen ist für die Zukunft zu erhoffen, daß die Lipoid A-Antikörper der IgM-Klasse bei Standardisierung der ELISA-Methode und Verbesserung der Titerangaben wenigstens als Screeningverfahren für die Diagnostik der Pyelonephritis klinische Bedeutung erlangen.

Auffällig war bei der Querschnittsuntersuchung, daß in der Kontrollgruppe von Kindern ohne klinisch oder bakteriologisch festgestellte Infektion (Gruppe VI) 11 von 12 Getesteten ein positives Ergebnis bei den IgG-Antikörpern gegen Lipoid A hatten. Dieser Befund weist auf das Verbleiben von Lipoid A-Antikörpern im Serum von Gesunden hin, die wohl bei einer zurückliegenden Infektion durch gramnegative Bakterien mit der Produktion spezifischer Antikörper gegen Lipoid A geantwortet hatten. Nach unserer nur qualitativen Bewertung der Extinktionen bei der Serumverdünnung 1:10 (siehe 6.1.) kann noch nicht entschieden werden, ob die Antikörper bei den manifesten Infektionen in höherer Konzentration als bei den "Gesunden" der Kontrollgruppe vorliegen, zumal die ELISA-Resultate in den Extinktionshöhen von Versuch zu Versuch schwankten.

Bezüglich der IgM-Antikörper reagierten die Kontrollseren in 6 von 12 Fällen positiv, was nicht durch einen akuten bakteriologischen Nachweis gramnegativer Erreger zu erklären war. Wiederholungen von IgM-Bestimmungen bei einer größeren Kontrollgruppe und eine gründliche klinische Exploration sollten zur Klärung der Frage dienen, inwieweit IgM-Antikörper gegen Lipoid A auf eine noch inapparente oder latente Infektion deuten.

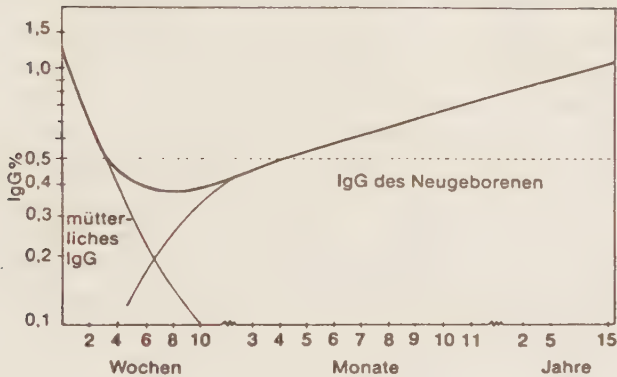
Von 19 bzw. 16 Patienten mit Sepsis durch gramnegative Bakterien wurden die Lipoid A-Antikörper der IgG- bzw. IgM-Fraktion bestimmt. Hervorzuheben ist, daß nur 4 von 19 Patienten in der IgG-Testung positiv eingestuft wurden, was im Vergleich mit der Kontrollgruppe überrascht (siehe Tabelle 4). Werden die Sepsiskranken nach dem Alter in 2 Gruppen unterteilt, ist von den 10 Kindern über 3 Monate sogar nur eines IgG-positiv, das aber mit einem Lebensalter von 3 Monaten und 8 Tagen aufgrund der exakten Grenze von 3 Monaten in die Gruppe der "älteren" Kinder gelangte und eher der Gruppe der Säuglinge bis 3 Monate zuzuordnen wäre. Die positiven IgG-Werte verteilen sich so eindeutig auf die "jüngeren" Sepsiskranken, mit positiven IgG-Bewertungen in 3 (+1) von 9 (+1) Fällen (siehe Tabelle 7). Negative IgG-Antikörper bei nachgewiesener Bakteriämie sprechen entweder für einen Verbrauch der (auch bei Gesunden anzutreffenden!) Immunglobuline gegen Lipoid A durch eine mögliche Antigen-Antikörper-Komplexbildung im Serum oder aber für einen Mangel in der IgG-Produktion als prädisponierenden Faktor einer Sepsis. Als Hypothese ist nach den vorliegenden ELISA-Ergebnissen anzunehmen, daß Kinder mit einer mangelnden Immunantwort auf das Lipoid A-Antigen leichter an einer generalisierten Erkrankung durch gramnegative Bakterien wie Sepsis erkranken. Dieser Hypothese liegt die Vorstellung zugrunde, daß Lipoid A-Antikörper im Serum eine schützende Wirkung gegen eintretende gramnegative Bakterien entfalten und

endotoxische Wirkungen aufzuheben vermögen. Der erwartete Schutzeffekt von Antiseren gegen Lipoid A oder inkomplette Lipopolysaccharide wurde in den vergangenen Jahren auch klinisch untersucht; die dabei beobachteten Wirkungen werden im nächsten Abschnitt 6.3. diskutiert.

Trotz massiver Bakteriämie zeigten nur 6 der 16 untersuchten Sepsispatienten positive IgM-Ergebnisse für Lipoid A-Antikörper. Eigentlich wäre zu fordern, daß die Auseinandersetzung mit den gramnegativen Bakterien und dem im Rahmen der Lyse freigesetzten Antigen Lipoid A zu einer raschen Stimulation der IgM-Produktion als Frühantwort führt. Da eine schnelle IgM-Antwort offensichtlich nicht regelmäßig einsetzt, rückt der in vivo-Ablauf der Immunogenität von Lipoid A in den Blickpunkt der klinischen Fragestellungen. Es ist zu vermuten, daß die Bindung der Lipopolysaccharide an die High-Density-Lipoproteine (HDL) als Transportprotein vor der Elimination im retikuloendothelialen System (RES) die immunogene Wirkung des in kryptischer Position im LPS-Molekül postierten Lipoid A-Anteils hemmend beeinflusst (33).

Für die Sepsisgruppe ergab die Altersunterteilung bei der IgM-Bestimmung nicht die bei den IgG-Resultaten erwähnte Verschiebung positiver Resultate, die vielleicht mit dem diaplazentaren Übertritt mütterlicher Lipoid A-Antikörper zu erklären sind. Bekanntlich existiert ein maternofetaler Transfer wegen der Molekülgröße nur für Immunglobuline der IgG-Fraktion, während IgM-Antikörper nicht übertragen werden. Wie mütterliche IgG-Antikörper bei langsam einsetzender IgG-Synthese des Neugeborenen noch im Serum zirkulieren, zeigt schematisch die folgende Abbildung, die einem Lehrbuch der Immunologie entnommen wurde:

Abb. 6 Serum-IgG-Spiegel nach der Geburt
(aus Bier et al. (7))



Für unsere IgG-Bestimmungen der Sepsiskranken ist also bei den nur 4 positiven Resultaten, die alle Kleinkinder im Alter bis zu 3 Monaten betreffen, zu diskutieren, ob es sich um persistierende mütterliche Antikörper handelt, die aber nicht protektiv gegen die Septikämie wirken.

Sehr heterogen war die Zusammensetzung der Gruppen IV und V der Querschnittsuntersuchung mit Trachealkolonisationen und Wundinfektionen durch gramnegative Bakterien.

Der Anteil von Kindern unter 3 Monaten lag in der Gruppe IV, die hauptsächlich Patienten mit Langzeitintubation oder Tracheostoma umfaßte, mit 10 von 17 sehr hoch. Die Möglichkeit mütterlicher IgG-Antikörper gegen Lipoid A im Serum der Neugeborenen müßte auch hier erwogen werden, doch gab es selbst bei den Kindern unter 3 Monaten nur einen von 10 Fällen mit positivem IgG; vergleichsweise hatten 2 der 7 älteren Kinder ein positives IgG-Resultat (siehe Tabelle 7). Bemerkenswert ist ferner, daß insgesamt nur 2 Kinder mit Trachealkolonisation IgM-Antikörper gegen Lipoid A aufwiesen, wobei die Patienten unter 3 Monaten in allen 9 Fällen negativ waren (siehe Tabellen 10 und 13). Damit wird die Auffassung

unterstrichen, wonach gramnegative Bakterien in einem Trachealabstrich nicht als Zeichen einer "Infektion" bewertet werden können, sondern lediglich eine "Kolonisation" der Luftwege ausdrücken. Die wenigen positiven Ergebnisse für Lipoid A-Antikörper erlauben bei den Trachealkolonisationen keine verallgemeinernden Schlussfolgerungen, ohne den Krankheitsverlauf genau zu analysieren und zwischen den einfachen bakteriellen Besiedelungen und wirklichen Infektionen zu differenzieren. Auf jeden Fall sind die zum Teil schweren Grunderkrankungen als Ursache einer Immunschwäche mit zu berücksichtigen, um die kaum vorhandenen IgG-Antikörper auch bei den älteren Kindern zu erklären.

Die Verlaufsbeobachtung einzelner Kinder mit Trachealkolonisation (Abschnitt 5.2.2.4.4.) bewies, daß sich die IgM-Antikörper trotz wiederholt pathologischer Trachealabstriche fast nie veränderten. Positive IgM-Werte sind nicht mit der alleinigen Trachealbesiedelung zu korrelieren, sondern entsprechen dem invasiven Lipoid A-Antigenstimulus, z.B. bei einer Pneumonie oder einer anderen Infektion durch gramnegative Bakterien.

Nur von 6 Patienten mit gramnegativen Bakterien in Wundabstrichen z.B. nach Operationen oder Verbrennungen wurden die Lipoid A-Antikörper untersucht; wegen der geringen Fallzahl und den ganz verschiedenen Krankheitsbildern verbietet sich neben der kasuistischen Betrachtung einzelner Verlaufstestungen eine Interpretation der Wundinfektionen als eigene Gruppe. Zwar wurden bei der Querschnittsuntersuchung einige positive Werte für IgG und IgM gegen Lipoid A gemessen, doch zeigten die Antikörper bei den Verläufen (Abschnitt 5.2.2.4.5.) keine eindeutigen Anstiege nach den Wundabstrichen.

Wie schon im Abschnitt 5.2.1.4. über die Ergebnisse der Querschnittsuntersuchung von Lipoid A-Antikörpern bei verschiedenen Erkrankungen dargestellt wurde, unterschieden sich die qualitativ bewerteten Resultate der 6 Diagnosegruppen statistisch signifikant. Die aus diesen Ergebnissen abzuleitenden theoretischen Erwägungen wurden, auch unter Berücksichtigung des Alters der Patienten, auf den zurückliegenden Seiten diskutiert.

Die Unterteilung der insgesamt 93 Patienten ergab ein fast ausgewogenes Verhältnis von 43 Jungen zu 50 Mädchen bei IgG (Tabelle 8), das sich bei der IgM-Testung mit 36 Jungen zu 48 Mädchen leicht zugunsten der letzteren verschob (Tabelle 14). Mehr Mädchen als Jungen befanden sich vor allem in den Gruppen I und II mit HWI bzw. PN, was auf die Häufigkeit der Infektionen der Harnwege beim weiblichen Geschlecht hinweist. Die Aufschlüsselung der ELISA-Ergebnisse für die 6 Gruppen nach dem Geschlecht läßt ein sehr ähnliches Verteilungsmuster der positiven, fraglich positiven und negativen Bewertungen erkennen (Tabellen 9 und 15). In der IgM-Bestimmung haben die 3 getesteten Jungen mit Pyelonephritis wie 14 von 15 Mädchen dieser Gruppe II positive Lipoid A-Antikörper im Serum.

In der Phase II der ELISA-Bestimmungen, den im Abschnitt 5.2.2. behandelten Verlaufsbeobachtungen, wurden von insgesamt 42 Patienten der Gruppen I bis V zwischen minimal 2 bis zu 7 Seren je Kind getestet (Tabellen 16 und 17). Da die Zahl der Verlaufsbeobachtungen sich von Gruppe zu Gruppe deutlich unterschied, insbesondere aber auch die Serenzahl pro Patient zu sehr schwankte und die Intervalle zwischen den Serumentnahmen beträchtlich differierten, war eine statistische Zusammenfassung der 42 Antikörperverläufe nicht möglich. Die Auswertung der Verläufe geschah nach der Auflistung für jede der 5 Gruppen mit gramnegativen

bakteriologischen Befunden in der Form einer Kasuistik interessanter Einzelfälle, die in den Abschnitten 5.2.2.4.1. bis 5.2.2.4.5. graphisch aufgezeichnet und interpretiert wurden. Auf die Verläufe der Trachealkolonisationen und Wundinfektionen ist bereits verwiesen worden.

Bei den "Verläufen" von Harnwegsinfektionen waren nur in 2 Fällen Seren im Abstand von mehr als 10 Tagen gesammelt worden, so daß kaum Antikörperbewegungen zu erfassen waren. Die individuelle Interpretation der Mehrfachtestungen enthält der Abschnitt 5.2.2.4.1., für die pathogenetischen Aspekte der Lipoid A-Antikörper bei Harnwegsinfektionen ergaben sich dabei keine neuen Anhaltspunkte.

Verlaufstestungen über Zeiträume von mehreren Monaten konnten bei 6 Pyelonephritiskranken durchgeführt werden (Abschnitt 5.2.2.4.2.). Bei 4 dieser Patienten lagen die IgM-Werte konstant im positiven Bereich, womit die Hypothese des permanenten Antigenstimulus durch Lipoid A im Nierengewebe wohl gefestigt werden kann! Die ausgewählten Einzelbeobachtungen wurden schon im Ergebnisteil bei der Verbindung der Extinktionsdaten mit den klinischen Angaben über den Krankheitsverlauf besprochen.

Von 9 Sepsiskranken waren Verlaufstestungen mehrerer Serumproben über einige Wochen bis zu Monaten möglich, in 3 Fällen überdeckten die gesammelten Seren nur ein Intervall weniger Tage (Abschnitt 5.2.2.4.3.). Die Resultate des fehlenden IgG-Anstiegs trotz Septikämie erstaunten nach dem Befund der überwiegend niedrigen IgG-Werte in der Querschnittsuntersuchung nicht. Nur bei einem erst 2 Wochen alten Mädchen mit Coli-Sepsis wechselten die IgG-Werte vom negativen in den positiven Bereich, wofür vielleicht die Übertragung von IgG-Antikörpern durch die stattgefundene Blutaustauschtransfusion verantwortlich war, sowie bei einem

3 Monate alten Mädchen mit Sepsis durch Enterobacter oder Serratia, das in der Akutphase der Sepsis noch keine IgG-Antikörper besaß, diese aber im folgenden halben Jahr bei mehreren Kontrollen aufwies.

Die überwiegende Anzahl der Patienten mit Sepsis hatte im getesteten Verlauf konstant negative oder in einigen Fällen gleichbleibend positive Werte für IgG-Antikörper gegen Lipoid A. Die in der Querschnittsuntersuchung generierte These einer Sepsisprädisposition bei Patienten mit nicht vorbestehenden IgG-Antikörpern, die dann auf die Septikämie nicht durch Antikörperkomplexbildung reagieren könnten, wird dadurch nicht in Frage gestellt. Der fehlende IgG-Anstieg unterstreicht sicher die Theorie einer ungenügenden Immunantwort dieser Patienten. Für die positiven IgG-Werte bei den Neugeborenen wird die Möglichkeit der diaplazentaren Übertragung herangezogen; bei nur 2 älteren Patienten war offensichtlich eine Immunisierung gegen Lipoid A durch frühere Infektionen der Sepsis vorausgegangen.

In unsere ELISA-Untersuchungen schlossen wir auch einige wenige Patienten mit Meningitis, Morbus Crohn und Mukoviszidose ein, für die positive Lipoid A-Antikörperwerte erwartet wurden (5.2.3.).

Herauszustellen ist, daß bei den 2 Mädchen mit Meningitis durch gramnegative Bakterien über Wochen kein IgM-Anstieg zu verfolgen war. Dieser Befund einer fehlenden Antikörperreaktion trotz bakteriologischem Liquorbefund müßte bei einer größeren Zahl von Meningitispatienten kontrolliert werden.

In früheren Untersuchungen hatten P. Schüßler und W. Marget die Lipoid A-Antikörpertiter mit dem passiven Hämolysetest bei entzündlichen Darmerkrankungen gemessen und wegen der statistisch signifikanten Erhöhung der Lipoid A-Antikörpertiter beim Morbus Crohn im Vergleich zu Colitis ulcerosa,

akuten Enteritiden und Gesunden die Vermutung einer Beteiligung von Enterobacteriaceae am Krankheitsgeschehen des Morbus Crohn geäußert (75, 76, 107). Die Serumimmunglobuline beim Morbus Crohn wurden von W. Kruis, P. Schüßler et al. bestimmt und mit den Lipoid A-Antikörpern verglichen. Sie stellten Erhöhungen der Serum-IgM-Konzentrationen bei den Crohn-Patienten mit erhöhten Lipoid A-Antikörpern fest. Die Serum-IgM-Veränderungen könnten demnach Ausdruck einer Antikörperbildung gegen Lipoid A beim Morbus Crohn sein (67). Bei Bestimmungen der Lipoid A-Antikörper im Serum von Crohn-Patienten mit ELISA bestätigten I. Mattsby-Baltzer et al. die Antikörpererhöhungen im Vergleich zu Patienten mit anderen entzündlichen Darmerkrankungen nicht, sondern fanden sogar erniedrigte IgG-Werte gegen Lipoid A bei ausgedehnten Entzündungen. In dieser Untersuchung gab es keine Unterschiede der Lipoid A-Antikörper bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (84). Wegen der differierenden Beobachtungen sollten auch Serumproben von Crohn-Patienten mit der ELISA-Methode weiter auf Lipoid A-Antikörper der Klassen IgG und IgM getestet werden, um die mögliche pathogenetische Bedeutung von Lipoid A beim Morbus Crohn zu klären.

Im Rahmen dieser Arbeit verfügten wir nur über Serumproben von 2 weiblichen Crohn-Patientinnen im Alter von 12 und 15 Jahren, die beide positive IgM-Antikörper gegen Lipoid A hatten. Fraglich bleibt, ob eine IgM-Antwort für den Morbus Crohn typisch ist.

Bei Patienten mit Mukoviszidose wäre von Interesse, ob diese frühzeitig durch die häufigen Lungeninfektionen, z.B. mit *Pseudomonas aeruginosa*, hohe Lipoid A-Antikörpertiter erlangen. 2 Jungen von 8 und 11 Jahren reagierten in der IgG-Testung deutlich positiv, nur der ältere war auch IgM-positiv gegen Lipoid A.

6.3. Schutzeffekte von Antiseren gegen Endotoxin

Wie bereits im Abschnitt 3. über Antikörper gegen Lipoid A ausgeführt wurde, belegten E.T. Rietschel und C. Galanos in Tierexperimenten die schützende Wirkung spezifischer Lipoid A-Antiseren gegen die endotoxischen Effekte von Lipoid A (103).

Die immunogene Komponente des Lipoid A wurde inzwischen zahlreich untersucht, um auch möglichst effektive Antiseren zu erhalten. S. Izui et al. verglichen die Antikörperantworten auf verschiedene Lipopolysaccharidpräparationen in vivo bei Mäusen und fanden eine lang anhaltende Produktion von IgM und IgG nur bei Verwendung Lipoid A-reicher, polysaccharidfreier LPS von *Salmonella minnesota* R 595 (57). P.C. Fink et al. immunisierten Mäuse ebenfalls mit Lipoid A-angereicherten Bakterien des *Salmonella minnesota*-Stammes R 595 und erzielten durch die Anwendung einer Zellhybridisierung hohe Konzentrationen spezifischer Lipoid A-Antikörper; die Produktion monoklonaler Antikörper gegen Lipoid A sollte in Zukunft möglich sein (31).

Auf die grundlegenden Arbeiten von M. Westenfelder über die pathogenetische Bedeutung des Lipoid A bei der chronischen Pyelonephritis wurde in 6.2. verwiesen (120, 122, 123, 124). Nach dieser Theorie hat Lipoid A durch die Bildung von Immunkomplexen mit Lipoid A-Antikörpern in der Niere lokal einen schädigenden Einfluß. Bestätigend sind die Ergebnisse von G.P. Hemstreet et al., die nach der Injektion von Lipoid A in Rattennieren kreuzreagierende zytotoxische Antikörper bestimmten und damit die Annahme einer (Auto-)Immungeneses bei der PN erhärteten (47). Histologisch sahen sie bei der Lipoid A-induzierten Nephritis wie bei der PN Nekrosen der Tubuluszellen, gegen die die zytotoxischen Antikörper gerichtet waren (46). I. Mattsby-Baltzer et al. stellten bei experimentellen ascendierenden *E. coli*-Pyelonephritiden we-

sentlich häufiger Lipoid A-Antikörper im Serum fest als bei Versuchstieren ohne PN; dieser Befund stimmt mit unseren ELISA-Ergebnissen für PN und HWI überein (82). In der Untersuchung einer möglichen Immunisierung gegen die Pyelonephritis konnte mit der passiven Übertragung von Lipoid A-Antikörpern aber keine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen die Pyelonephritis bewirkt werden. Die Interpretation dieses Befundes lautete, daß Lipoid A-Antikörper im Serum offensichtlich die Invasion von Bakterien in die Niere bei der aufsteigenden Pyelonephritis nicht verhindern können, vielleicht aufgrund der nicht ausreichenden Exposition des Lipoid A-Anteils auf der Zelloberfläche der Bakterien. Einen Schutz gegen die Pyelonephritis erreichten Mattsby-Baltzer und Mitarbeiter jedoch nach peroraler Immunisierung mit lebenden *E. coli*-Bakterien durch die spezifischen Antikörper gegen die O- und K-Antigene von *Escherichia coli* (83).

Der mögliche Schutzeffekt von Lipoid A-Antikörperseren darf aber nicht allein für lokal ausgelöste Pyelonephritiden betrachtet werden. Ähnliche histologische Veränderungen wie bei der PN beobachteten A.V. Richman et al. an Nieren von Patienten, die nach gramnegativer Sepsis und akutem Nierenversagen verstorben waren (100). Als Ursache diskutierten sie eine generelle vom Endotoxin (= Lipoid A) vermittelte Gefäßschädigung für die Nierenläsionen bei Sepsis.

Gerade wegen der häufigen Nierenkomplikationen bei der Sepsis durch gramnegative Bakterien erschien es dringend geboten, die antitoxischen Eigenschaften der Lipoid A-Antikörper zu nutzen. E.N. Wardle wies in einer Übersichtsarbeit zur Bedeutung von anti-Lipoid A darauf hin, daß der protektive Effekt reiner Lipoid A-Antikörperpräparationen nach vorliegenden Untersuchungen wohl gering ist, eine deutliche schützende biologische Wirksamkeit aber für Antikörper gegen leicht abgewandelte bzw. erweiterte Lipoid A-Moleküle belegt werden kann (119). In Bestimmungen mit dem passiven Hämolyse-test hatte Wardle zusammen mit D. Blake et al. nur relativ

niedrige Lipoid A-Antikörpertiter gemessen (8); dies bildete den Ausgangspunkt der Überlegung, ob mit der Übertragung antitoxischer Seren nicht allgemein eine prophylaktische Verbesserung der Abwehrsituation gegenüber der gramnegativen Bakteriämie gewährleistet werde - zumindest bei den durch fatale Endotoxinwirkungen besonders gefährdeten Risikopatienten (siehe auch 134).

Schon 1973 hatten A.I. Braude et al. veröffentlicht, daß mit Antiseren gegen Endotoxin die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), einer der gefährlichsten Effekte der gramnegativen Bakteriämie, bei Kaninchen zu verhindern war (13). Da die Reaktion unabhängig von Antikörpern gegen das O-Antigen eintrat, konnte gefolgert werden, daß sich die schützenden Antikörper gegen den toxischen Lipoid A-Anteil richteten. Weil die gramnegative Sepsis trotz antibiotischer Therapie eine der häufigsten Todesursachen unter den Infektionskrankheiten darstellt und der Anteil der nosokomialen gramnegativen Bakteriämien gestiegen ist (65, 66), wurden in den letzten Jahren Seren mit antiendotoxischen Antikörpern als Therapieversuch bei Sepsiskranken eingesetzt. In der klinischen Erprobung fanden Antiseren gegen die J5-Mutante von E. coli O111 Verwendung, deren inkomplettes Lipopolysaccharid auf Lipoid A und lediglich einige core-Determinanten reduziert ist. Die Antikörper dieser Antiseren sind also wahrscheinlich spezifisch gegen das toxische Prinzip der gramnegativen Bakterien wirksam.

In einer randomisierten kontrollierten Studie der Arbeitsgruppe um E.J. Ziegler und A.I. Braude konnte die Letalität schwerkranker Sepsispatienten durch die Applikation von J5-Antiserum erheblich gesenkt werden. Vorläufige Ergebnisse erschienen 1981 (14), nach Abschluß der Studie 1982 betrug die Letalität der mit J5-Serum Behandelten nur 22 % gegenüber 39 % bei den Sepsiskranken ohne Immuntherapie (139). Die Autoren stellten fest, daß bei Risikopatienten die Behandlung mit J5-Antiserum auch als prophylaktische Maßnahme zur Vermeidung einer gramnegativen Sepsis mit fatalem Ausgang erwogen werden sollte. Die Modellvorstellung besagt,

daß bei Gefährdeten zuwenig Antikörper gegen Endotoxin im Serum zirkulieren, wodurch die toxischen Antigene bei eintretender Bakteriämie nicht ausreichend abgefangen werden. J5-Antikörper gegen das core-Lipopolysaccharid würden so einer Sepsis-Prädisposition entgegenwirken, indem sie die Toxizität der gramnegativen Bakterien neutralisierten.

M. Johns et al. belegten in umfangreichen tierexperimentellen Untersuchungen, daß J5-Antiserum eine größere protektive Kapazität gegen die Lipoid A-Wirkungen besitzt als das Antiserum mit reinen Lipoid A-Antikörpern. Dieses Phänomen ist vielleicht mit der Beteiligung von KDO aus der LPS-core-Region an den immunodeterminanten Strukturen zu erklären, befindet sich aber noch in der Diskussion (58).

Eine beträchtliche Senkung der Letalität erzielten E. Lachman et al. bei Patientinnen einer Frauenklinik mit septischem Schock, denen sie Präparationen mit anti-LPS-Antikörpern gaben (69). Als vorteilhaft bei dieser wirksamen Immuntherapie bemerkten sie, daß die anti-LPS-Seren einfach durch Screeninguntersuchungen z.B. in einer Blutbank zu gewinnen waren, während für die Herstellung der J5-Antisera zunächst Freiwillige mit der J5-Mutante von E. coli immunisiert werden mußten. Eine ELISA-Methode zur Bestimmung von anti-Endotoxin-Antikörpern in menschlichen Seren als Screeningverfahren beschrieben S.L. Gaffin et al. (35).

Zusammenfassend ergibt sich, daß die Immuntherapie mit gegen die endotoxisch wirksamen LPS-Strukturen gerichteten Antisera eine erfolgreiche Behandlung der gramnegativen Sepsis in Aussicht stellt.

Bei den ELISA-Bestimmungen der vorliegenden Arbeit wurden in der Gruppe der Sepsiskranken kaum positive IgG-Werte für Lipoid A-Antikörper gemessen, was für eine eingeschränkte Immunreaktion der betroffenen Kinder sprach. Dabei ist zu erwähnen, daß die Kontrollpatienten ohne akute Infektion positive IgG-Werte hatten.

Die ELISA-Resultate unterstreichen die Theorie einer Krankheitsdisposition bei niedrigen Lipoid A-Antikörpern (IgG!),

die zu den beschriebenen Therapieversuchen mit Antiseren veranlaßte.

Die im Abschnitt 6.2. diskutierte Hypothese, daß Patienten mit mangelnder Immunantwort auf das Lipoid A-Antigen leichter an einer gramnegativen Sepsis erkranken, wird in einer 1985 erschienenen Arbeit von P.C. Fink und C. Galanos bestätigt (140). Sie untersuchten mit ELISA die Lipoid A-Antikörper bei Erwachsenen, die an multiplem Myelom oder Makroglobulinämie Waldenström litten.

Im Vergleich zu Gesunden hatten die Patienten mit Paraproteinämien geringere Lipoid A-Antikörperaktivitäten im Serum. Die höchsten Infektionsraten wiesen die Patienten auf, bei denen ein allgemeiner Antikörpermangel und ein erniedrigter Lipoid A-Antikörperspiegel bestanden. Daraus wurde ebenfalls der Schluß gezogen, daß das Fehlen von Lipoid A-Antikörpern Infektionen durch gramnegative Bakterien begünstigen könnte.

Lipoid A-Antikörperbestimmungen sollten bei Sepsiskranken weiter durchgeführt werden, um aus genauen Titerangaben die Abwehrlage gegenüber der Infektion durch gramnegative Bakterien beurteilen zu können.

Wünschenswert wäre die zukünftige Entwicklung der Lipoid A-Antikörperbestimmungen mit ELISA zu einer Methode, die als Indikator für eine eventuell nützliche Immuntherapie mit spezifischen Antiseren bei schweren Erkrankungen wie gramnegativer Sepsis dient.

7. Zusammenfassung

Die Lipopolysaccharide auf der Zellwand gramnegativer Bakterien bestehen aus drei Regionen. Außen lagert das O-spezifische Polysaccharid (Region I), dem das weniger variable Kernpolysaccharid folgt (Region II). Innen schließt sich das sogenannte Lipoid A an (Region III); sein chemischer Aufbau ist bei fast allen gramnegativen Bakterien sehr ähnlich. Lipoid A wurde als der biologisch aktive Anteil der Lipopolysaccharide identifiziert, der die vielfältigen endotoxischen Effekte vermittelt. Trotz der Bedeckung durch Polysaccharidstrukturen wirkt Lipoid A als schwaches Antigen und führt zur Bildung spezifischer Lipoid A-Antikörper. Auch beim Menschen treten Lipoid A-Antikörper nach Infektionen durch gramnegative Bakterien auf und sind mit dem passiven Hämolysetest nachzuweisen. Die Anwendung des ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) erlaubt die getrennte Testung der IgG- und IgM-Fraktionen von Lipoid A-Antikörpern im Serum.

Mit einem nicht-kompetitiven Enzymimmunoassay vom sandwich-Typ wurden die Lipoid A-Antikörper bei Kindern mit verschiedenen Infektionen durch gramnegative Bakterien bestimmt. Die Querschnittsuntersuchung erfaßte 93 Kinder (43 Jungen und 50 Mädchen) im Alter von wenigen Wochen bis zu 16 Jahren. Nach Art der Infektion wurden die Patienten auf 5 Gruppen mit bakteriologischem Befund und eine Kontrollgruppe ohne Infektion verteilt. Die Auswertung der bei der Serumverdünnung 1:10 gemessenen Extinktionen erfolgte als Einstufung in die Kategorien "positiv", "fraglich positiv" und "negativ". Gruppenweise wurden die Bewertungen für die Kinder mit Harnwegsinfektion (n = 17), Pyelonephritis (n = 22), Sepsis (n = 19), Trachealkolonisation (n = 17), Wundinfektion (n = 6) und die Kontrollgruppe (n = 12) zusammengestellt. In einer nicht-parametrischen Varianzanalyse wurden die Gruppen nach der Häufigkeit positiver und negativer Resultate verglichen.

Sowohl bei der IgG- als auch bei der IgM-Testung unterschieden sich die Lipoid A-Antikörperergebnisse der 6 Gruppen signifikant.

Auffallend war, daß 11 von 12 Kindern der Kontrollgruppe positive IgG-Werte als Zeichen einer abgelaufenen Immunisierung gegen Lipoid A besaßen; dagegen hatten nur 4 (sehr junge) von 19 Kindern mit Sepsis bei der Antikörpertestung ein positives IgG-Resultat. Der Mangel an IgG wurde als ungenügende Immunantwort auf Lipoid A und möglicher Ausdruck einer Sepsisprädisposition interpretiert. 17 von 18 Kindern mit Pyelonephritis und nachgewiesenen Nierenveränderungen zeigten positive IgM-Antikörper gegen Lipoid A im Serum, im Gegensatz zu nur 7 IgM-positiven von 16 Patienten mit unkomplizierter Harnwegsinfektion. Wir deuteten den Befund als Indiz für einen permanenten Antigenstimulus im Nierengewebe bei der Pyelonephritis. Die Theorien einer (Auto-)Immungenes der Pyelonephritis mit schädigenden Komplexen aus Lipoid A-Antigen und spezifischen Antikörpern im Nierenparenchym wurden diskutiert.

Die heterogene Zusammensetzung der Gruppen erlaubte bei den Trachealkolonisationen und Wundinfektionen keine allgemeinen Aussagen.

Von 42 Patienten konnten in einer zweiten Versuchsphase zwischen 2 und 7 Seren je Kind im Verlauf getestet werden. Die Beobachtungsintervalle wechselten von einigen Tagen über Wochen bis zu Monaten. Die Verläufe wurden für jede der Diagnosegruppen aufgelistet und interessante Befunde in einer kasuistischen Betrachtung unter Einbeziehung klinischer Angaben interpretiert. Die Verlaufsbeobachtungen unterstützten die bei der Querschnittsuntersuchung geäußerten Hypothesen über die Bedeutung von Lipoid A-Antikörpern. Einzeltestungen von Patienten mit Meningitis, Morbus Crohn und Mukoviszidose boten Anlaß zu weiteren theoretischen Erwägungen. Breiten Raum nimmt in der Dis-

kussion der mögliche Schutzeffekt von Antiseren gegen Endotoxin bzw. Lipoid A ein. Die Ergebnisse der vorliegenden Lipoid A-Antikörperbestimmungen werden in Beziehung zu Berichten über die erfolgreiche Immuntherapie mit Antiseren bei Sepsiskranken gesetzt.

8. Literaturverzeichnis

- 1) Ahlstedt, S., Carlsson, B., Hanson, L.A., Kaijser, B., Mattsby-Baltzer, I., Sohl-Akerlund, A.: Application of the ELISA for determination of immunoglobulin class specific Escherichia coli antibodies. Scand.J.Immunol. (Suppl. 7) 8 (1978) 119-127
- 2) Aoki, S., Imamura, S., Aoki, M., McCabe, W.R.: "Abacterial" and bacterial pyelonephritis. Immunofluorescent localization of bacterial antigen. N.Engl.J.Med. 281 (1969) 1375-1382
- 3) Ayme, G., Caroff, M., Chaby, R., Haeffner-Cavaillon, N., LeDur, A., Moreau, M., Muset, M., Mynard, M.-C., Roumiantzeff, M., Schulz, D., Szabo, L.: Biological activities of fragments derived from Bordetella pertussis endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. Infect.Immun. 27 (1980) 739-745
- 4) Banerji, B., Kenny, J.J., Scher, I., Alving, C.R.: Antibodies against liposomes in normal and immune-defective mice. J.Immunol. 128 (1982) 1603-1607
- 5) Beger, H.G., Gögler, H., Kraas, E., Bittner, R.: Endotoxin bei bakterieller Peritonitis. Chirurg 52 (1981) 81-88
- 6) Berry, L.J.: Pathogenesis of atoxicogenic strains of gram-negative bacteria - a hypothesis. Klin.Wochenschr. 60 (1982) 693-695
- 7) Bier, O.G., Götze, D., Mota, I., Dias da Silva, W.: Experimentelle und klinische Immunologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1979, pp 325-326
- 8) Blake, D., Hamlyn, A.N., Proctor, S., Wardle, E.N.: Anti-endotoxin (anti-lipid-A) antibodies. Experientia 36 (1980) 254-255
- 9) Brade, H., Galanos, C.: Isolation, purification, and chemical analysis of the lipopolysaccharide and lipid A of Acinetobacter calcoaceticus NCTC 10305. Eur.J.Biochem. 122 (1982) 233-237
- 10) Brade, H., Galanos, C.: A new lipopolysaccharide antigen identified in Acinetobacter calcoaceticus: occurrence of widespread natural antibody. J.Med.Microbiol. 16 (1983) 203-210
- 11) Brade, H., Galanos, C.: Biological activities of the lipopolysaccharide and lipid A from Acinetobacter calcoaceticus. J.Med. Microbiol. 16 (1983) 211-214

- 12) Brade, H., Galanos, C.:
Common lipopolysaccharide specificity: new type of antigen residing in the inner core region of S- and R-form lipopolysaccharides from different families of gram-negative bacteria.
Infect.Immun. 42 (1983) 250-256
- 13) Braude, A.I., Douglas, H., Davis, C.E.:
Treatment and prevention of intravascular coagulation with antiserum to endotoxin.
J.Infect.Dis. 128 (1973) S157-164
- 14) Braude, A.I., Ziegler, E.J., McCutchan, J.A.
Douglas, H.:
Immunization against nosocomial infection.
Am.J.Med. 70 (1981) 463-466
- 15) Broady, K.W., Rietschel, E.T., Lüderitz, O.:
The chemical structure of the lipid A component of lipopolysaccharides from *Vibrio cholerae*.
Eur.J.Biochem. 115 (1981) 463-468
- 16) Bryant, R.E., Chamovitz, B.N., Morse, S.A., Apicella, M.A., Morthland, V.H.:
Endotoxin contamination of enzyme conjugates used in enzyme-linked immunosorbent assays.
J.Clin.Microbiol. 17 (1983) 1050-1053
- 17) Bullock, S.L., Walls, K.W.:
Evaluation of some of the parameters of the enzyme-linked immunospecific assay.
J.Infect.Dis. 136 (1977) S279-285
- 18) Carlsson, B., Sohl, A.:
The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used for determination of milk, saliva and urine antibodies against the O-antigen of *Escherichia coli*.
Persönliche Mitteilung, 2 S
- 19) Dahinden, C., Galanos, C., Fehr, J.:
Granulocyte activation by endotoxin.
I. Correlation between adherence and other granulocyte functions, and role of endotoxin structure on biologic activity.
J.Immunol. 130 (1983) 857-862
- 20) Dahinden, C., Fehr, J.:
Granulocyte activation by endotoxin.
II. Role of granulocyte adherence, aggregation, and effect of cytochalasin B, and comparison with formylated chemotactic peptide-induced stimulation.
J.Immunol. 130 (1983) 863-868
- 21) Dahlen, G., Mattsby-Baltzer, I.:
Lipid A in anaerobic bacteria.
Infect.Immun. 39 (1983) 466-468
- 22) Daschner, F., Marget, W.:
Treatment of recurrent urinary tract infection in children.
II. Compliance of parents and children with antibiotic therapy regimen.
Acta Pädiatr.Scand. 64 (1975) 105-108

- 23) Engvall, E., Perlmann, P.:
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochemistry 8 (1971) 871-874
- 24) Engvall, E., Perlmann, P.:
Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA.
III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-
labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.
J. Immunol. 109 (1972) 129-135
- 25) Engvall, E.:
Quantitative enzyme immunoassay (ELISA) in microbiology.
Med. Biol. 55 (1977) 193-200
- 26) Eskenazy, M., Naumova, F., Tekelieva, R., Konstantinov, G.:
Quantitation of rabbit immunoglobulin G antibodies to
Salmonella minnesota Re by enzyme-linked immunosorbent
assay.
J. Clin. Microbiol. 16 (1982) 276-280
- 27) Fink, P.C., Galanos, C.:
Determination of anti-lipid A and lipid A by enzyme
immunoassay.
Immunobiology 158 (1981) 380-390
- 28) Fink, P.C.:
Lipopolysaccharide and Lipid A. I. Humoral Wirkungs-
weisen.
Med. Laborat. 34 (1981) 101-107
- 29) Fink, P.C.:
Lipopolysaccharide and Lipid A. II. Zelluläre Wirkungs-
weisen.
Med. Laborat. 34 (1981) 240-250
- 30) Fink, P.C., Lehr, L., Urbaschek, R.M., Kozak, J.:
Limulus amoebocyte lysate test for endotoxemia:
investigations with a femtogram sensitive spectro-
photometric assay.
Klin. Wochenschr. 59 (1981) 213-218
- 31) Fink, P.C., Hittmann, F., Schedel, I.:
Production of anti-lipid A antibody by a hybridoma
cell line.
Fresenius Z. Anal. Chem. 311 (1982) 360-361
- 32) Freudenberg, M.A., Galanos, C.:
Interaction of lipopolysaccharides and lipid A with
complement in rats and its relation to endotoxicity.
Infect. Immun. 19 (1978) 875-882
- 33) Freudenberg, M.A., Bøgg-Hansen, T.C., Back, U.,
Galanos, C.:
Interaction of lipopolysaccharides with plasma
high-density lipoprotein in rats.
Infect. Immun. 28 (1980) 373-380
- 34) Freudenberg, M.A., Freudenberg, N., Galanos, C.:
Time course of cellular distribution of endotoxin in
liver, lungs and kidneys of rats.
Br. J. Exp. Path. 63 (1982) 56-65

- 35) Gaffin, S.L., Badsha, N., Brock-Utne, J.G., Vorster, B.J., Conradie, J.D.:
An ELISA procedure for detecting human anti-endotoxin antibodies in serum.
Ann.Clin.Biochem. 19 (1982) 191-194
- 36) Galanos, C., Lüderitz, O., Westphal, O.:
A new method for the extraction of R lipopolysaccharides.
Eur.J.Biochem. 9 (1969) 245-249
- 37) Galanos, C., Lüderitz, O., Westphal, O.:
Preparations and properties of antisera against the lipid-A component of bacterial lipopolysaccharides.
Eur.J.Biochem. 24 (1971) 116-122
- 38) Galanos, C., Lüderitz, O.:
Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms.
Eur.J.Biochem. 54 (1975) 603-610
- 39) Galanos, C.:
Physical state and biological activity of lipopolysaccharides. Toxicity and immunogenicity of the lipid A component.
Z.Immun.-Forsch. 149 (1975) 214-229
- 40) Galanos, C., Freudenberg, M., Hase, S., Jay, F., Ruchmann, E.:
Biological activities and immunological properties of lipid A.
in: Schlesinger, D. (ed.), "Microbiology", American Society for Microbiology, Washington D.C. 1977, pp 269-276
- 41) Galanos, C., Roppel, J., Weckesser, J., Rietschel, E.T., Mayer, H.:
Biological activities of lipopolysaccharides and lipid A from Rhodospirillaceae.
Infect.Immun. 16 (1977) 407-412
- 42) Galanos, C., Lüderitz, O., Westphal, O.:
Preparation and properties of a standardized lipopolysaccharide from Salmonella abortus equi (Novo-Pyrexal).
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 243 (1979) 226-244
- 43) Galanos, C., Freudenberg, M.A., Lüderitz, O., Rietschel, E.T., Westphal, O.:
Chemical, physicochemical and biological properties of bacterial lipopolysaccharides.
in: Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (Limulidae), Alan R. Liss Inc., New York 1979, pp 321-332
- 44) Greer, G.G., Rietschel, E.T.:
Lipid A-induced tolerance and hyperreactivity to hypothermia in mice.
Infect.Immun. 19 (1978) 357-368

- 45) Greer, G.G., Rietschel, E.T.:
Inverse relationship between the susceptibility
of lipopolysaccharide (lipid A)-pretreated mice
to the hypothermic and lethal effect of lipopoly-
saccharide.
Infect.Immun. 20 (1978) 366-374
- 46) Hemstreet, G.P., Enoch, P.G., Fine, P.R., Wheat, R.:
Lipid A induction of cytotoxic antibody to cultured
syngeneic rat kidney tubular cells.
Kidney Int. 19 (1981) 275-280
- 47) Hemstreet, G.P. III., Brown, A.L., Fine, P.R.,
Molay, M.P., Wheat, R.:
Salmonella minnesota Re 595 lipid A induced nephritis.
J.Urol. 127 (1982) 374-378
- 48) Hiernaux, J.R., Baker, P.J., Delisi, C., Rudbach, J.A.:
Modulation of the immune response to lipopolysaccharide.
J.Immunol. 128 (1982) 1054-1058
- 49) Hill, H.R., Matsen, J.M.:
(Medical perspective) Enzyme-linked immunosorbent assay
and radioimmunoassay in the serologic diagnosis of
infectious diseases.
J.Infect.Dis. 147 (1983) 258-263
- 50) Hofman, J., Dlabac, V.:
The role of lipid A in phagocytosis of gram-negative
bacteria and their lipopolysaccharides.
J.Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 18 (1974)
447-453 (191-197)
- 51) Hofmann, K., Marget, W., Belohradsky, B.:
Veränderte bakterielle Periurethralflora bei jungen
Mädchen mit chronisch rekurrierenden Harnwegsinfek-
tionen?
Infection 9 (1981) 252-254
- 52) Holst, O., Borowiak, D., Weckesser, J., Mayer, H.:
Structural studies on the phosphate-free lipid A of
Rhodomicrobium vannielii ATCC 17100.
Eur.J.Biochem. 137 (1983) 325-332
- 53) Huland, H., Busch, R., Riebel, T.:
Renal scarring after symptomatic and asymptomatic
upper urinary tract infection: a prospective study.
J.Urol. 128 (1982) 682-685
- 54) Huth, K., Schmahl, F.W., Oehler, G., Hassinger, R.,
Heckers, H., Blumenthal, J.:
Endotoxin-bedingte Stoffwechselstörungen.
Fortschr.Med. 93 (1975) 1664-1668
- 55) Isibasi, A., Jiménez, E., Kumate, J.:
Clearance and tissue distribution of intravenously
injected Salmonella typhi polysaccharide in rabbits.
Infect.Immun. 42 (1983) 949-954

- 56) Ito, J.I., Wunderlich, A.C., Lyons, J., Davis, C.E.
Guiney, D.G., Braude, A.I.:
Role of magnesium in the enzyme-linked immunosorbent
assay for lipopolysaccharides of rough *Escherichia*
coli strain J5 and *Neisseria gonorrhoeae*.
J.Infect.Dis. 142 (1980) 532-537
- 57) Izui, S., Eisenberg, R.A., Dixon, F.J.:
Subclass-restricted IgG polyclonal antibody production
in mice injected with lipid A-rich lipopolysaccharides.
J.Exp.Med. 153 (1981) 324-338
- 58) Johns, M., Skehill, A., McCabe, W.R.:
Immunization with rough mutants of *Salmonella minnesota*.
IV. Protection by antisera to O and rough antigens
against endotoxin.
J.Infect.Dis. 147 (1983) 57-67
- 59) Joiner, K.A., McAdam, K.P.W.J., Kasper, D.L.:
Lipopolysaccharides from *Bacteroides fragilis* are
mitogenic for spleen cells from endotoxin responder
and nonresponder mice.
Infect. Immun. 36 (1982) 1139-1145
- 60) Kasai, N.:
Structure and function of lipid A.
Jpn.J.Med.Sci.Biol. 35 (1982) 110-111
- 61) Kataoka, T., Inoue, K., Galanos, C., Kinsky, S.C.:
Detection and specificity of lipid A antibodies using
liposomes sensitized with lipid A and bacterial lipo-
polysaccharides.
Eur.J.Biochem. 24 (1971) 123-127
- 62) Kawahara, K., Uchida, K., Aida, K.:
Isolation of an unusual 'lipid A' type glycolipid from
Pseudomonas paucimobilis.
Biochim.Biophys.Acta 712 (1982) 571-575
- 63) Kelsey, M.C., Lipscomb, A.P., Mowles, J.M.:
Limulus amoebocyte lysate endotoxin test: an aid to
the diagnosis in the septic neonate?
J.Infect. 4 (1982) 69-72
- 64) Kenedi, E., Laburn, H., Mitchell, D., Ross, F.P.:
On the pyrogenic action of intravenous lipid A in
rabbits.
J.Physiol. 328 (1982) 361-370
- 65) Kreger, B.E., Craven, D.E., Carling, P.C., McCabe, W.R.:
Gram-negative bacteremia.
III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology
in 612 patients.
Am.J.Med. 68 (1980) 332-343

- 66) Kreger, B.E., Craven, D.E., McCabe, W.R.:
Gram-negative bacteremia.
IV.Re-evaluation of clinical features and treatment
in 612 patients.
Am.J.Med. 68 (1980) 344-355
- 67) Kruis, W., Paulus, W., Fateh-Moghadam, A., Schüßler,
P., Eisenburg, J.:
Serum-Immunglobulinkonzentrationen bei Morbus Crohn.
Klinische Bedeutung und Vergleich mit Lipoid-A-Anti-
körpern.
Z.Gastroenterol. 19 (1981) 276-283
- 68) Kusama, H.:
Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of
Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharides.
J.Clin.Microbiol. 17 (1983) 317-322
- 69) Lachman, E., Pitsoe, S.B., Gaffin, S.L.:
Anti-lipopolysaccharide immunotherapy in management
of septic shock of obstetric and gynaecological origin.
Lancet, May 5 (1984) 981-983
- 70) Landes, R.R., Morrison, D.C.:
Biochemical mechanisms of lipid-A-mediated enhancement
of platelet secretory responses to aggregated immuno-
globulins.
Am.J.Pathol. 104 (1981) 196-205
- 71) Lüderitz, O., Galanos, C., Lehmann, V., Nurminen, M.,
Rietschel, E.T., Rosenfelder, G., Simon, M., Westphal,
O.:
Lipid A: chemical structure and biological activity.
J.Infect.Dis. 128 (1973) S17-29
- 72) Lüderitz, O., Freudenberg, M.A., Galanos, C., Lehmann,
V., Rietschel, E.T., Shaw, D.H.:
Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria.
in: Bronner, F., Kleinzeller, A. (eds.), Current Topics
in Membranes and Transport, Vol. 17, Membrane Lipids of
Prokaryotes, Academic Press, New York 1982, pp 79-151
- 73) Marget, W., Reindke, B.:
Neuere Betrachtungen zur Frage der Pathogenese der nicht-
obstruktiven chronischen Harnwegsinfektionen.
Med.Klin. 69 (1974) 1767-1773
- 74) Marget, W., Westenfelder, M., Galanos, C.:
Immunoresponse to gram-negative bacteria in infants:
an aspect of pathogenesis of urinary tract infections.
in: Urbaschek, B., Urbaschek, R., Neter, E. (eds.),
Gram-Negative Bacterial Infections and Mode of Endotoxin
Actions, Springer-Verlag, Wien, New York 1975, pp 40-46

- 75) Marget, W., Schüßler, P., Kruis, W., Weinzierl, M., Rindfleisch, G.:
Is the pathogenesis of Crohn's disease similar to that of juvenile recurrent pyelonephritis?
Infection 4 (1976) 110-112
- 76) Marget, W., Schüßler, P.:
Lipopolysaccharides in Crohn's disease.
Lancet, July 10 (1976) 97
- 77) Marget, W., Weiß, M., Ruhland, B.:
Lipid A antibody determinations using ELISA on patients at a children's hospital: a preliminary report.
Infection 11 (1983) 84-86
- 78) Marget, W., Weiß, M., Ruhland, B.:
Lipid A antibodies in infected children.
Skriptum für Vortrag bei "International Congress for Infectious Diseases", Wien, 27.Aug.1983 -nicht veröffentlicht-
- 79) Mathison, J.C., Ulevitch, R.J.:
In vivo interaction of bacterial lipopolysaccharide (LPS) with rabbit platelets: modulation by C3 and high density lipoproteins.
J.Immunol. 126 (1981) 1575-1580
- 80) Mattsby-Baltzer, I., Kaijser, B.:
Lipid A and anti-lipid A.
Infect.Immun. 23 (1979) 758-763
- 81) Mattsby-Baltzer, I., Claesson, I., Hanson, L.A., Jodal, U., Kaijser, B., Lindberg, U., Peterson, H.:
Antibodies to lipid A during urinary tract infection.
J.Infect.Dis. 144 (1981) 319-328
- 82) Mattsby-Baltzer, I., Hanson, L.A., Kaijser, B., Larsson, P., Olling, S., Svanborg-Eden, C.:
Experimental Escherichia coli ascending pyelonephritis in rats: changes in bacterial properties and the immune response to surface antigens.
Infect.Immun. 35 (1982) 639-646
- 83) Mattsby-Baltzer, I., Hanson, L.A., Olling, S., Kaijser, B.:
Experimental Escherichia coli ascending pyelonephritis in rats: active peroral immunization with live Escherichia coli.
Infect.Immun. 35 (1982) 647-653
- 84) Mattsby-Baltzer, I., Fasth, A., Jaup, B., Kaijser, B., Nilsson, L.A.:
Studies of antibodies to lipid A and Tamm-Horsfall in patients with inflammatory bowel disease.
Scand.J.Gastroenterol. 18 (1983) 305-311

- 85) Mergenthaler, H.G., Staber, F.G., Hültner, L.,
Dörmer, P.:
The response of murine splenic granulocyte-macrophage
colony-forming cells to lipid A in vivo.
Exp.Hematol. 10 (1982) 637-649
- 86) Mintz, C.S., Deibel, R.H.:
Effect of lipopolysaccharide mutations on the
pathogenesis of experimental Salmonella gastro-
enteritis.
Infect.Immun. 40 (1983) 236-244
- 87) Mita, A., Ohta, H., Mita, T.:
In vivo activation of mouse spleen lymphocytes by
lipid A in carrier-free form.
Immunology 45 (1982) 333-340
- 88) Mita, A., Ohta, H., Mita, T.:
Induction of splenic T cell proliferation by lipid A
in mice immunized with sheep red blood cells.
J.Immunol. 128 (1982) 1709-1711
- 89) Mullan, N.A., Newsome, P.M., Cunningham, P.G., Palmer,
G.H., Wilson, M.E.:
Protection against gram-negative infections with anti-
serum to lipid A from Salmonella minnesota R 595.
Infect.Immun. 10 (1974) 1195-1201
- 90) Munford, R.S., Hall, C.L., Dietschy, J.M.:
Binding of Salmonella typhimurium lipopolysaccharides
to rat high-density lipoproteins.
Infect.Immun. 34 (1981) 835-843
- 91) Munford, R.S., Hall, C.L., Lipton, J.M., Dietschy, J.M.:
Biological activity, lipoprotein-binding behavior, and
in vivo disposition of extracted and native forms of
Salmonella typhimurium lipopolysaccharides.
J.Clin.Invest. 70 (1982) 877-888
- 92) Neter, E.:
Bacterial hemagglutination and hemolysis.
Bacteriol.Rev. 20 (1956) 166-188
- 93) Neter, E., Gorzynski, E.A., Gino, R.M., Westphal, O.,
Lüderitz, O.:
The enterobacterial hemagglutination test and its
diagnostic potentialities.
Can.J.Microbiol. 2 (1956) 232-244
- 94) Neter, E.:
The role of the pathogen and of the host in pathogenesis:
an overview.
Klin.Wochenschr. 60 (1982) 691-692
- 95) Osborn, M.J., Rick, P.D., Rasmussen, N.S.:
Mechanism of assembly of the outer membrane of Salmonella
typhimurium.
J.Biol.Chem. 255 (1980) 4246-4251

- 96) Parker, J.H., Smith, G.A., Frederickson, H.L., Vestal, J.R., White, D.C.:
Sensitive assay, based on hydroxy fatty acids from lipopolysaccharide lipid A, for gram-negative bacteria in sediments.
Appl.Environ.Microbiol. 44 (1982) 1170-1177
- 97) Qureshi, N., Takayama, K., Ribí, E.:
Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*.
J.Biol.Chem. 257 (1982) 11808-11815
- 98) Ravin, H.A., Rowley, D., Jenkins, C., Fine, J.:
On the absorption of bacterial endotoxin from the gastrointestinal tract of the normal and shocked animal.
J.Exp.Med. 112 (1960) 783-792
- 99) Reindke, B., Daschner, F., Morgenroth, H., Belohradsky, B., Leuthner, G., Marget, W.:
Value of screening for bacteriuria in infancy.
in: Kass, E.H., Brumfitt, W. (eds.), Infections of the Urinary Tract, University of Chicago Press, Chicago/London 1978, pp 31-34
- 100) Richman, A.V., Okulski, E.G., Balis, J.U.:
New concepts in the pathogenesis of acute tubular necrosis associated with sepsis.
Ann.Clin.Lab.Sci. 11 (1981) 211-219
- 101) Rietschel, E.T., Kim, Y.B., Watson, D.W., Galanos, C., Lüderitz, O., Westphal, O.:
Pyrogenicity and immunogenicity of lipid A complexed with bovine serum albumin or human serum albumin.
Infect.Immun. 8 (1973) 173-177
- 102) Rietschel, E.T., Lüderitz, O.:
Chemical structure of lipopolysaccharides and endotoxin immunity.
Z.Immun.-Forsch. 149 (1975) 201-213
- 103) Rietschel, E.T., Galanos, C.:
Lipid A antiserum-mediated protection against lipopolysaccharide- and lipid A-induced fever and skin necrosis.
Infect.Immun. 15 (1977) 34-49
- 104) Rietschel, E.T., Wollenweber, H.-W., Zähringer, U., Lüderitz, O.:
Lipid A, the lipid component of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity.
Klin.Wochenschr. 60 (1982) 705-709
- 105) Saunders, G.C., Clinard, E.H., Bartlett, M.L., Sanders, W.M.:
Application of the indirect enzyme-labeled antibody microtest to the detection and surveillance of animal disease.
J.Infect.Dis. 136 (1977) S258-266

- 106) Schade, U., Rietschel, E.T.:
The role of prostaglandins in endotoxic activities.
Klin.Wochenschr. 60 (1982) 743-745
- 107) Schüßler, P., Kruis, W., Marget, W.:
Lipoid-A-Antikörpertiter bei Morbus Crohn.
Klin.Wochenschr. 54 (1976) 1055-1056
- 108) Schuurs, A.H.W.M., van Weemen, B.K.:
Enzyme-immunoassay.
Clin.Chim.Acta 81 (1977) 1-40
- 109) Schwartz, M.M., Cotran, R.S.:
Common enterobacterial antigen in human chronic
pyelonephritis and interstitial nephritis. An
immunofluorescent study.
N.Engl.J.Med. 289 (1973) 830-835
- 110) Shillitoe, E.J.:
Decline in specificity of the ELISA due to storage of
serum, and its recovery by adsorption with kaolin.
J.Virol.Methods 4 (1982) 241-248
- 111) Sidorczyk, Z., Zähringer, U., Rietschel, E.T.:
Chemical structure of the lipid A component of the
lipopolysaccharide from a *Proteus mirabilis* Re-mutant.
Eur.J.Biochem. 137 (1983) 15-22
- 112) Simon, G., Reindke, B., Marget, W.:
Lipoid-A-Antikörpertiter bei Pyelonephritis und anderen
Infektionen mit gram-negativen Bakterien.
Infection 2 (1974) 178-184
- 113) Sullivan O', M.J., Bridges, J.W., Marks, V.:
Enzyme immunoassay: a review.
Ann.Clin.Biochem. 16 (1979) 221-240
- 114) Tanamoto, K., Homma, J.Y.:
Essential regions of the lipopolysaccharide of
Pseudomonas aeruginosa responsible for pyrogenicity
and activation of the proclotting enzyme of horseshoe
crabs. Comparison with antitumor, interferon-inducing
and adjuvant activities.
J.Biochem. 91 (1982) 741-746
- 115) Van Weemen, B.K., Schuurs, A.H.W.M.:
Immunoassay using antigen-enzyme conjugate.
FEBS Lett. 15 (1971) 232-235
- 116) Voller, A., de Savigny, D.:
Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).
in Thompson, R.A. (ed.), Techniques in Clinical
Immunology, Blackwell Scientific Publications,
Oxford 1981, pp 157-169.
- 117) Walenga, R.W., Osborn, M.J.:
Biosynthesis of lipid A. In vivo formation of an
intermediate containing 3-deoxy-D-mannoctulosonate
in a mutant of *Salmonella typhimurium*.
J.Biol.Chem. 255 (1980) 4252-4256

- 118) Walenga, R.W., Osborn, M.J.:
Biosynthesis of lipid A. Formation of acyl-deficient lipopolysaccharides in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*.
J.Biol.Chem. 255 (1980) 4257-4263
- 119) Wardle, E.N.:
The importance of anti-lipid A (anti-endotoxin): prevention of "shock lung" and acute renal failure.
World J.Surg. 6 (1982) 616-623
- 120) Westenfelder, M., Galanos, C.:
Experimental lipid A-induced nephritis in the dog.
Infection 2 (1974) 174-177
- 121) Westenfelder, M., Galanos, C., Withöft, A., Lang, G.:
Vorkommen, Bedeutung und klinische Konsequenz der Lipoid A-Antikörper-Titer bei Patienten mit Harnwegsinfekt.
Infection 5 (1977) 144-148
- 122) Westenfelder, M., Galanos, C., Madsen, P.O., Marget, W.:
Pathological activities of lipid A: experimental studies in relation to chronic pyelonephritis.
in: Schlesinger, D. (ed.), "Microbiology", American Society for Microbiology, Washington D.C. 1977, pp 277-279
- 123) Westenfelder, M.:
Lipoid A, ein Faktor in der Pathogenese der chronischen Pyelonephritis. Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Bedeutung einer Lipoid A-abhängigen pathologischen Immunreaktion.
Habil.schrift Freiburg 1977
- 124) Westenfelder, M., Galanos, C., Marget, W.:
Role of antibodies to lipid A in nephritis induced by lipid A: a possible mechanism in the pathogenesis of chronic pyelonephritis.
in: Kass, E.H., Brumfitt, W. (eds.), Infections of the Urinary Tract, University of Chicago Press, Chicago/London 1978, pp 100-104
- 125) Westphal, O., Lüderitz, O., Bister, F.:
Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser.
Z.Naturforsch. 7b (1952) 148-155
- 126) Westphal, O., Lüderitz, O.:
Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gram-negativer Bakterien.
Angew.Chem. 66 (1954) 407-417
- 127) Westphal, O.:
Bacterial endotoxins.
The 2nd Carl Prausnitz Memorial Lecture.
Int.Arch.Allergy Appl.Immun. 49 (1975) 1-43

- 128) Westphal, O., Lüderitz, O., Rietschel, E.T., Galanos, C.:
Bacterial lipopolysaccharide and its lipid A component: some historical and some current aspects.
Biochem.Soc.Trans. 9 (1981) 191-195
- 129) Westphal, O., Jann, K., Himmelsbach, K.:
Chemistry and immunochemistry of bacterial lipopolysaccharides as cell wall antigens and endotoxins.
in: Prog.Allergy, 33, Karger-Verlag, Basel 1983, pp 9-39
- 130) Wichmann, U., Marget, W.:
Parameter zur Diagnose akuter Schübe von chronischer Pyelonephritis im Kindesalter.
Arch.Kinderheilkunde 182 (1971) 240-247
- 131) Wilson, M.E., Morrison, D.C.:
Evidence for different requirements in physical state for the interaction of lipopolysaccharides with the classical and alternative pathways of complement.
Eur.J.Biochem. 128 (1982) 137-141
- 132) Wisdom, G.B.:
Enzyme-immunoassay
Clin.Chem. 22 (1976) 1243-1255
- 133) Wiznitzer, T., Better, N., Rachlin, W., Atkins, N., Frank, E.D., Fine, J.:
In vivo detoxification of endotoxin by the reticulo-endothelial system.
J.Exp.Med. 112 (1960) 1157-1166
- 134) Wolff, S.M.:
The treatment of gram-negative bacteremia and shock.
N.Engl.J.Med. 307 (1982) 1267-1268
- 135) Wollenweber, H.-W., Broady, K.W., Lüderitz, O., Rietschel, E.T.:
The chemical structure of lipid A. Demonstration of amide-linked 3-acyloxyacyl residues in Salmonella minnesota Re lipopolysaccharide.
Eur.J.Biochem. 124 (1982) 191-198
- 136) Wollenweber, H.-W., Schlecht, S., Lüderitz, O., Rietschel, E.T.:
Fatty acid in lipopolysaccharides of Salmonella species grown at low temperature. Identification and position.
Eur.J.Biochem. 130 (1983) 167-171
- 137) Wunderlich, P., Brunner, F., Galanos, C., Hermle, M., Müller-Brand, J., Thiel, G.:
Endotoxinwirkung auf intravasales Volumen und Nierenfunktion im Akutversuch bei der Ratte.
Schweiz.Med.Wochenschr. 111 (1981) 1912-1915

- 138) Yasuda, T., Kanegasaki, S., Tsumita, T., Tadakuma, T., Homma, J.Y., Inage, M., Kusumoto, S., Shiba, T.: Biological activity of chemically synthesized analogues of lipid A. Demonstration of adjuvant effect in hapten-sensitized liposomal system.
Eur.J.Biochem. 124 (1982) 405-407
- 139) Ziegler, E.J., McCutchan, J.A., Fierer, J., Glauser, M.P., Sadoff, J.C., Douglas, H., Braude, A.I.: Treatment of gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant *Escherichia coli*.
N.Engl.J.Med. 307 (1982) 1225-1230

Nachtrag:

- 140) Fink, P.C., Galanos, C.: Serum anti-lipid A antibodies in multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinaemia.
Immunobiology 169 (1985) 1-10
- 141) Ruhland, B.: Dissertation München 1985, im Druck
- 142) Young, L.S.: Gram-negative sepsis.
in: Mandell, G.L., Douglas, R.G., Bennett, J.E. (eds.), Principles and Practice of Infectious Diseases, John Wiley & Sons, New York 1985, pp 460-463

LEBENS LAUF

geboren am	23.10.1959	in Mönchengladbach
Eltern		Günther Weiß, Textilingenieur, und Magda Weiß, geb. Glassmacher
Familienstand		ledig
Staatsangehörigkeit		deutsch
Konfession		katholisch
	1959-1962	wohnhaf in Oberbruch/Nordrhein- Westfalen
	1962-1980	wohnhaf in Kelsterbach/Hessen
	seit 1980	wohnhaf in München
Ausbildung:		
	1966-1969	Grundschule in Kelsterbach
	1969-1977	Max-Planck-Gymnasium in Rüsselsheim
	1977	Abitur
	1977-1984	Medizinstudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main (bis 1980) und der Ludwig-Maximilians-Universität in München (bis zum Studienabschluß 1984)
	1979	Ärztliche Vorprüfung
	1980	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	1983	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	1984	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation
	1979-1984	Förderung durch die Studienstiftung des deutschen Volkes
	1981-1985	Dissertation bei Herrn Prof.Dr.W.Marget in der Abteilung für Antimikrobielle Therapie und Infektionsimmunologie der Universitätskinderklinik München "Lipoid A-Antikörperbestimmungen mit ELISA bei Kindern mit Pyelonephritis, Sepsis und anderen Infektionen"
	seit 1984	Assistenzarzt am Städtischen Kranken- haus München-Bogenhausen in der II. Medizinischen Abteilung bei Herrn Prof.Dr.H. Kaess

DANKSAGUNG

Herrn Prof.Dr.W. Marget, Leiter der Abteilung für Antimikrobielle Therapie und Infektionsimmunologie der Universitätskinderklinik München, danke ich herzlichst für die Vergabe des Themas und seine wertvollen Ratschläge. Hervorheben möchte ich seine stetige Unterstützung und die zahlreichen Gelegenheiten zu persönlichen Gesprächen, aus denen sich wichtige Anregungen für die Arbeit ergaben.

Wesentlich für den Ablauf des experimentellen Teils der Untersuchungen waren die ausgezeichneten Bedingungen im bakteriologischen Labor der Kinderklinik.

Frau Gunhild Conrad und ihren Mitarbeiterinnen gilt mein Dank für die Hilfsbereitschaft bei den ELISA-Bestimmungen.

Herr Dr.C. Galanos vom Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg ermöglichte die Lipoid A-Antikörperbestimmungen durch die Überlassung der von ihm hergestellten Lipoid A-Antigenlösungen.

Herrn Thomas Zwingers aus dem Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik der Universität München (Vorstand Prof.Dr.K. Überla) bin ich für die Förderung der Versuchsauswertung und die statistische Beratung zu großem Dank verpflichtet.

